

**Erregbarkeitsänderungen in der Umgebung experimentell  
induzierter fokaler kortikaler Dysplasien eine Studie mit  
spannungssensitiven Farbstoffen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sabine Quill  
geboren am 13.12.1976  
in Hamm (Westfalen)

Gutachter:

1. Professor Dr. med. O. W. Witte
2. Professor Dr. med. U. Brandl
3. Professor Dr. med. E.-J. Speckmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. Dezember 2004

I.	Zusammenfassung	S. 4
II.	Einleitung	S. 6
III.	Ziele der Arbeit	S. 15
IV.	Material und Methoden	
1.	Induktion der Kälteläsion	
1.1	Versuchstiere	S. 16
1.2	Anästhesie	S. 16
1.3	Induktion der Kälteläsion	S. 16
2.	Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen	
2.1	Anfertigung der Hirnschnittpräparate	S. 17
2.2	Versuchsaufbau	S. 18
2.3	Versuchsablauf	S. 20
3.	Morphologische Aufarbeitung der Hirnschnittpräparate	
3.1	Histologische Färbung	S. 22
3.2	Immunhistochemische Färbung	S. 23
4.	Auswertung und Statistik	
4.1	Zuordnung der optischen Signale	S. 23
4.2	Bestimmung der Untersuchungsparameter	S. 24
4.3	Statistik	S. 25
V.	Ergebnisse	
1.	Morphologie und Lokalisation der kortikalen Läsionen	S. 27
2.	Erregbarkeitsänderungen im peridysplastischen Kortex	S. 27
2.1	Eigenschaften der Feldpotentiale und optischen Signale	S. 28
2.2	Amplituden	S. 29
2.2.1	Bestimmung der maximalen Amplitude	S. 31
2.2.2	Amplituden 25 und 50 ms post stimulus	S. 31
2.2.3	Zeitlicher Verlauf der optischen Signale	S. 34
2.3	Schichtspezifische Analyse der optischen Signale	S. 36
2.4	Bestimmung der Latenz	S. 38
3.	Erregbarkeitsänderungen im dysplastischen Kortex	S. 38

VI.	Diskussion	
	Übererregbarkeit im peridysplastischen Kortex	S. 41
	Laminäre Verteilung der Erregbarkeitsänderungen	S. 43
	Funktionelle Auswirkungen	S. 45
VII.	Schlussfolgerungen	S. 48
VIII.	Literaturverzeichnis	S. 50

## **I. Zusammenfassung**

Fokale kortikale Dysplasien umfassen eine heterogene Gruppe von angeborenen und erworbenen Störungen der Hirnrindenentwicklung, die durch die enormen Fortschritte der bildgebenden Verfahren immer häufiger als Ursache therapierefraktärer Epilepsien und neuropsychologischer Defizite diagnostiziert werden. Leider ist über die pathophysiologischen Auswirkungen dieser frühen Hirnschädigungen sowie die Mechanismen der Epileptogenese nur wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb, anhand von Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit das Ausmaß der funktionellen Störungen in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien genauer zu beurteilen. Die fokalen kortikalen Dysplasien wurden dazu nach dem von Dvorak und Feit beschriebenen Kälteläsionsmodell bei neugeborenen Ratten induziert. Die Untersuchung der kortikalen Erregbarkeit erfolgte im Hirnschnittpräparat erwachsener Tiere mit Hilfe des spannungssensitiven Farbstoffs RH 795 und eines hochauflösenden Photodiodenarrays (Durchmesser bei 10x Vergrößerung: 1.75 mm, 464 Kanäle, 800 frames/s). Synchron zur Registrierung der optischen Signale wurden Feldpotentiale abgeleitet.

Nach elektrischer Stimulation zeigten die optischen Signale im peridysplastischen Kortex (strukturell intakter, somatosensorischer Kortex) eine lang anhaltende neuronale Depolarisation in den supragranulären Schichten II/III, die bei Kontrolltieren nicht nachgewiesen werden konnte. Die Amplitude der optischen Signale war weiterhin 25 und 50 ms *post stimulus* signifikant erhöht und zeigte darüber hinaus eine bis zu 500 ms nach Stimulation anhaltende Erregbarkeitssteigerung. Vorangegangene Studien an menschlichem Gewebe sowie tierexperimentelle Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die funktionellen Veränderungen weit über den dysplastischen Kortex hinausgehen und auch im umgebenden strukturell intakten Kortex ausgeprägte Erregbarkeitsänderungen mit einem veränderten Verhältnis inhibitorischer und exzitatorischer Neurotransmitterfunktionen bestehen. Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Erregbarkeitsänderungen in der strukturell intakten Umgebung der Dysplasien ausschließlich in den oberen Kortexschichten auftreten. Die

Ergebnisse weisen damit auf eine gestörte kortikale Konnektivität in diesen Hirnregionen hin.

## **II. Einleitung**

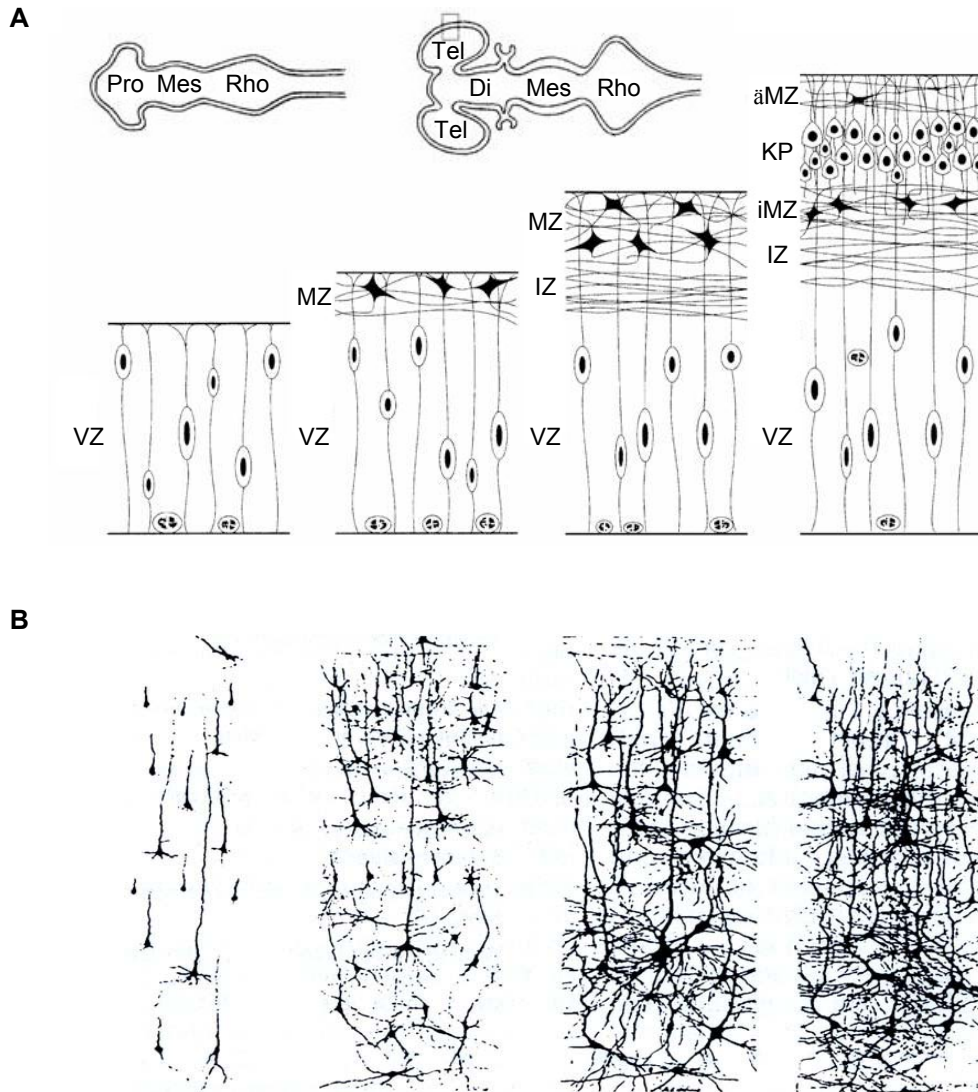
Unter kortikalen Dysplasien wird eine Gruppe von Störungen der Hirnrindenentwicklung verstanden, deren fehlerhafte kortikale Architektur durch eine abnormale Anordnung der Nervenzellen charakterisiert ist. Kortikale Dysplasien sind in ihren morphologischen und pathologischen Eigenschaften sehr vielgestaltig und bieten auch in ihrer klinischen Ausprägung ein pleomorphes Bild (Barkovich et al. 1992). Das Spektrum der assoziierten Erkrankungen reicht von schwerer mentaler Retardierung und neuropsychologischen Defiziten bis hin zu epileptischen Anfallsleiden, die häufig nur unzureichend behandelbar sind und mit Medikamenten nicht mehr beherrscht werden können (Guerrini et al. 1999; Palmini et al. 1991b). Die Ätiologie und die Pathogenese sind noch nicht vollständig geklärt, sie scheinen jedoch maßgeblich von genetischen und umweltbedingten Faktoren während der kortikalen Entwicklung beeinflusst zu sein (Gressens 1998).

Die normale Hirnrindenentwicklung vollzieht sich in drei Stadien, zusammengefasst in der Proliferation von Vorläuferzellen, der neuronalen Migration und der kortikalen Organisation (Abb. 1). In der ersten Phase der Entwicklung finden sich zahlreiche neuronale und gliale Vorläuferzellen in der proliferativen Zone der Neuralplatte, welche sich an der ventrikulären Oberfläche befindet. Von dort wandern die Zellen in der zweiten Phase entlang radiärer glialer Fasern zur pialen Oberfläche aus. Dies geschieht in zwei Etappen. Die erste Migration erfolgt etwa in der siebten Schwangerschaftswoche, wobei sich an der kortikalen Oberfläche die Marginalzone bildet. Aussprossende Afferenzen formieren oberhalb der Ventrikulärzone beinahe zeitgleich eine Intermediärzone, aus der die Zellen zur Marginalzone weiterwandern. Die Marginalzone übernimmt zu dieser Zeit schon mehrere Funktionen zur Erhaltung der neuronalen Migration, indem sie Signale zur Erhaltung der radiären Gliafasern aussendet, nachfolgenden Zellen ihren Platz innerhalb des sich bildenden Kortex weist und durch Stoppsignale ein Durchwandern in die äußere Schicht verhindert. In der achten bis neunten Schwangerschaftswoche führt die anhaltende neuronale Migration aus Ventrikulär- und Intermediärzone zur Ausbildung einer oberen und unteren Schicht innerhalb der Marginalzone, wodurch eine frühe kortikale Platte

entsteht. Die obere Schicht bildet in der weiteren Entwicklung die Lamina I, während aus der unteren später die Lamina VI hervorgeht. In der zehnten Schwangerschaftswoche erfolgt dann der zweite Schub der Zellwanderung aus der Ventrikulärzone. Jetzt werden die späteren Schichten II-V gebildet, wobei sich zunächst die unteren kortikalen Schichten formieren, die dann von Neuronen der oberen Schichten durchwandert werden („inside-out“-Prinzip). Etwa in der 15. Schwangerschaftswoche schließt sich die Phase der kortikalen Organisation an, in der sich die ortsständigen Zellen endgültig differenzieren, Neuriten aussprossen und kortikale Verbindungen gebildet werden. Die Vernetzung der kortikalen Laminae setzt sich postnatal noch weiter fort und scheint zeitlebens anzudauern.

Entsprechend dieser Entwicklungsphasen wurden die kortikalen Dysplasien in Störungen während der Zellproliferation, Zellmigration oder Zellorganisation eingeteilt (Barkovich et al. 1996; Hagemann et al. 2000). Zur genaueren Charakterisierung wurden darüber hinaus embryologische und genetische Merkmale, sowie radiologische, pathologische und histologische Aspekte herangezogen. Das Ergebnis ist eine Nomenklatur, die klinisch-morphologische Zusammenhänge erfasst und das Verständnis der vielfältigen Texturanomalien erleichtert. Störungen, die in der Proliferationsphase auftreten, zeigen dabei Anomalien, die durch eine abnormale Zellgröße und Zellstruktur charakterisiert sind. Störungen der neuronalen Migration führen dagegen zu einer aberranten Zellanordnung mit Vorkommen grauer Substanz in subependymalen oder subkortikalen Arealen. Malformationen, die auf einer gestörten kortikalen Organisation beruhen, sind vor allem durch eine abnormale kortikale Laminierung und Vernetzung gekennzeichnet (kortikale Dysplasien).





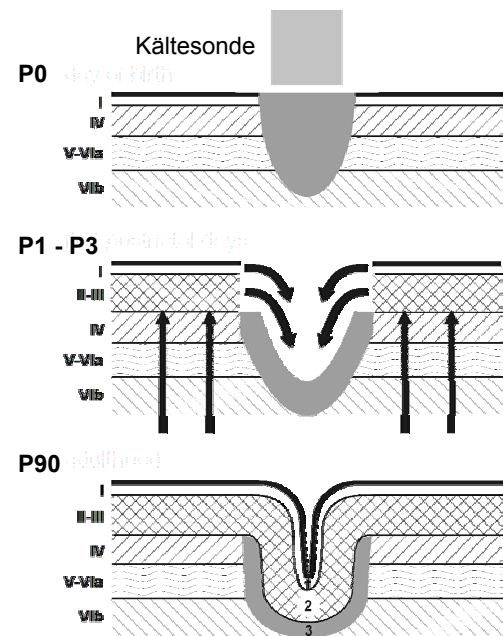
**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der physiologischen Hirnrindenentwicklung. **A:** Im linken oberen Bildabschnitt ist das kraniale Ende des Neuralrohrs abgebildet. Es sind zunächst drei primäre Hirnbläschen erkennbar: das Prosenzephalon, das Mesenzephalon und das Rhombenzephalon. Aus dem Prosenzephalon bilden sich etwa in der 5. Schwangerschaftswoche die Anlagen für die Großhirnhemisphären, das Telenzephalon, wobei am Übergang zum Mesenzephalon das Diencephalon entsteht. In der unteren Bildhälfte ist die kortikale Entwicklung zu vier Zeitpunkten anhand von Querschnitten durch die Wand des Telenzephalons gezeigt. Zunächst kommt es in der proliferativen Zone der Ventrikulärzone (VZ) zu einer intensiven Zellteilung. Postmitotische Zellen wandern sofort in die Marginalzone (MZ) aus, während durch einwachsende Afferenzen aus dem Diencephalon die Intermediärzone (IZ) entsteht. In Folge der anhaltenden Zellmigration wird die Marginalzone in eine innere (iMZ) und äußere Schicht (äMZ) geteilt und es formiert sich eine frühe kortikale Platte (KP). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wandern Neurone aus der Ventrikulärzone in die kortikale Platte ein, wobei zunächst die tiefen kortikalen Schichten und nachfolgend die oberen Laminae gebildet werden („inside-out“-Prinzip) (Redecker et al. 2000a). **B:** Die Abbildung zeigt die kortikale Organisation zu 4 aufeinander folgenden Zeitpunkten, bei Geburt, nach 3, 15, und 24 Monaten (von links nach rechts). Die Zellzahl vermehrt sich nicht mehr, die Differenzierung und Verzweigung der Dendriten nimmt jedoch erheblich zu. Es entsteht ein dichtes Netz synaptischer Verbindungen (modifiziert nach (Michaelis und Niemann 1999)).

Die Auswirkungen der kortikalen Dysplasien beim Menschen können sehr unterschiedlich sein. Klinische neuroradiologische Studien zeigten bei mehr als 50 % der Kinder, die aufgrund therapierefraktärer Anfallsleiden in Epilepsiezentren überwiesen wurden, Hirnrindenentwicklungsstörungen, wobei ca. 25 % dieser Patienten mit partiellen Anfällen fokale kortikale Malformationen aufwiesen (Kuzniecky et al. 1993). Bei erwachsenen Epilepsiepatienten wurden kortikale Dysplasien in ca. 15 % der untersuchten Fälle diagnostiziert (Dobyns WB und Kuzniecky R 1996). Die klinische Ausprägung der Epilepsien reicht dabei von einfachen und komplexen partiellen Anfällen über sekundär generalisierte Anfälle bis hin zum Status epilepticus. Klinische Untersuchungen fanden neben dem Auftreten medikamentös therapieresistenter Epilepsien bei 14 % der untersuchten Patienten neuropsychologische Defizite wie eine Dyslexie, 10 % wiesen eine Entwicklungsverzögerung auf und bei 9 % war eine mentale Retardierung auffällig (Raymond et al. 1995). In anderen Studien zeigte sich sogar in 44% der Fälle eine Minderung des Intelligenzquotienten auf unter 80 (Palmini et al. 1991b). Derartige Defizite der kognitiven Leistungen treten jedoch auch eigenständig, ohne die Ausprägung eines Anfallsleidens auf (Galaburda et al. 1985; Schachter et al. 1993).

Die Diagnostik kortikaler Malformationen hat im Zuge der Verbesserung bildgebender Verfahren, insbesondere mit der Weiterentwicklung der Magnetresonanztomographie, wesentliche Fortschritte gemacht. Bevor das MRT verfügbar war, wurden Hirnentwicklungsstörungen nur neuropathologisch oder chirurgisch erkannt und dementsprechend selten diagnostiziert. Mit Einführung des MRT wurde eine nicht-invasive Diagnostik kortikaler Malformationen bereits zu Lebzeiten möglich, wodurch klinisch-morphologische Zusammenhänge zwischen Hirnentwicklungsstörungen und neuropsychologischen Defiziten oder schweren Epilepsien immer häufiger aufgedeckt wurden. Gegenwärtig erlaubt die bildgebende Diagnostik bei einer Schnittdicke von 1.5 mm die Detektion sehr kleiner Anomalien, was ihre räumliche Auflösung um das doppelte verbesserte (Barkovich 1996). Darüber hinaus können feine morphologische Unterschiede innerhalb der Dysgenesien erkannt werden, wodurch zusätzlich auch die Spezifität gesteigert wurde (Lehericy et al. 1995; Raymond et al. 1995). Die Diagnose der verschiedenen Dysgenesien ist zwar durch die Verfeinerung der Bildgebung entscheidend

verbessert worden, die Fokussuche gestaltet sich jedoch weiterhin schwierig. Die epilepsiechirurgischen Behandlungserfolge, die nach Versagen der medikamentösen Therapie erwogen werden, sind aber stark an die präoperative Lokalisation des epileptogenen Fokus in der bildgebenden und elektrographischen Diagnostik gekoppelt (Sisodiya 2000). Die im MRT definierte Größe der Läsion und das Auftreten epileptiformer Aktivität im Elektroenzephalogramm (EEG) oder im intraoperativ erfassten Elektrokortikogramm (ECoG) stimmen in ihren Abmessungen allerdings häufig nicht überein. Fokale kortikale Malformationen zeigen elektrographisch oftmals größere Ausdehnungen als im MRT (Palmini et al. 1994). In solchen Fällen kann die funktionelle Bildgebung, insbesondere die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die Abgrenzung erleichtern (Chugani et al. 1988; Lee et al. 1994). Klinische Studien zeigten, dass die Ergebnisse der PET zur Darstellung des lokalen Metabolismus in guter Übereinstimmung zu denen des intraoperativ erfassten ECoGs stehen (Olson et al. 1990). Die im ECoG registrierte epileptiforme Aktivität korrespondierte mit den metabolischen Veränderungen im PET in den entsprechenden Hirnarealen, während CT- und MRT-Aufnahmen teilweise normal erschienen (Chugani et al. 1990). Palmini und Kollegen (Palmini et al. 1995) analysierten deshalb die Aussagen des MRT, EEG und ECoG im Hinblick auf den Erfolg der chirurgischen Therapie. Sie zeigten, dass eine möglichst weite Exzision der sichtbaren Dysplasie den größten Einfluss auf den Therapieerfolg hat (Palmini et al. 1991a). 77 % der untersuchten Patienten, bei denen 50 bis 100 % der Läsion entfernt werden konnte, zeigten postoperativ gute Ergebnisse, während bei einer Exzision unter 50 % keiner der Patienten annähernd die gleichen Erfolge erzielte (Palmini et al. 1991a). Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die Gewebeentfernung allein anhand der diagnostischen Befunde unsicher und eine Resektion von möglicherweise gesundem Hirngewebe ist dabei nicht ausgeschlossen. Ein besseres Verständnis der elektrophysiologischen und metabolischen Eigenschaften kortikaler Dysplasien könnte vermutlich erheblich zum Therapieerfolg beitragen und die Behandlungsmöglichkeiten verbessern. Durch die Entwicklung tierexperimenteller Dysplasiemodelle ergibt sich die Chance, die Pathophysiologie der Hirnentwicklungsstörungen genauer zu untersuchen. Einen entscheidenden Vorteil bietet hierbei die Ratte, da ihre

Kortexentwicklung am Tag der Geburt noch nicht abgeschlossen ist. So können fokale kortikale Dysplasien noch *post partum* induziert werden, wobei sie in ihrer Morphologie menschlichen Malformationen ähneln. Dvorak und Feit (Dvorak und Feit 1977) konnten im Tiermodell zeigen, dass eine am Tag der Geburt (P 0) induzierte, transkortikale Kälteläsion alle histologischen Charakteristika einer humanen Polymikrogyrie aufweist. Sowohl klinisch als auch experimentell zeigen diese fokalen kortikalen Malformationen statt einem sechsschichtigen nur einen drei- bis vierschichtigen Kortex mit Verlust der infragranulären Laminae (Jacobs et al. 1996; Rosen et al. 1992; Suzuki und Choi 1991). Diesem Phänomen liegt als pathogenetischer Faktor häufig eine hypoxische Schädigung des sich entwickelnden Gehirns zugrunde (Humphreys et al. 1990; Humphreys et al. 1991). Da die kortikale Entwicklung einem „inside-out“-Prinzip folgt, nach dem Neurone der Schicht VI zuerst und Zellen der Schicht II zuletzt in den Kortex einwandern (Altman und Bayer 1990), werden bei Induktion einer Gefrierläsion am Tag der Geburt vor allem die unteren kortikalen Schichten zerstört (Humphreys et al. 1991; Rosen et al. 1996). Neurone der supragranulären Schichten, deren Migration noch nicht abgeschlossen ist, wandern daraufhin durch die laminäre Nekrose in den Kortex ein (Humphreys et al. 1991). Bedingt durch das unterschiedliche Wachstum des dysplastischen, 4-schichtigen und des benachbarten, 6-schichtigen Kortex, faltet sich das dysplastische Gewebe ein und formiert den Mikrosulcus (Abb. 2). Aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Entstehung und Ausprägung von klinischen und



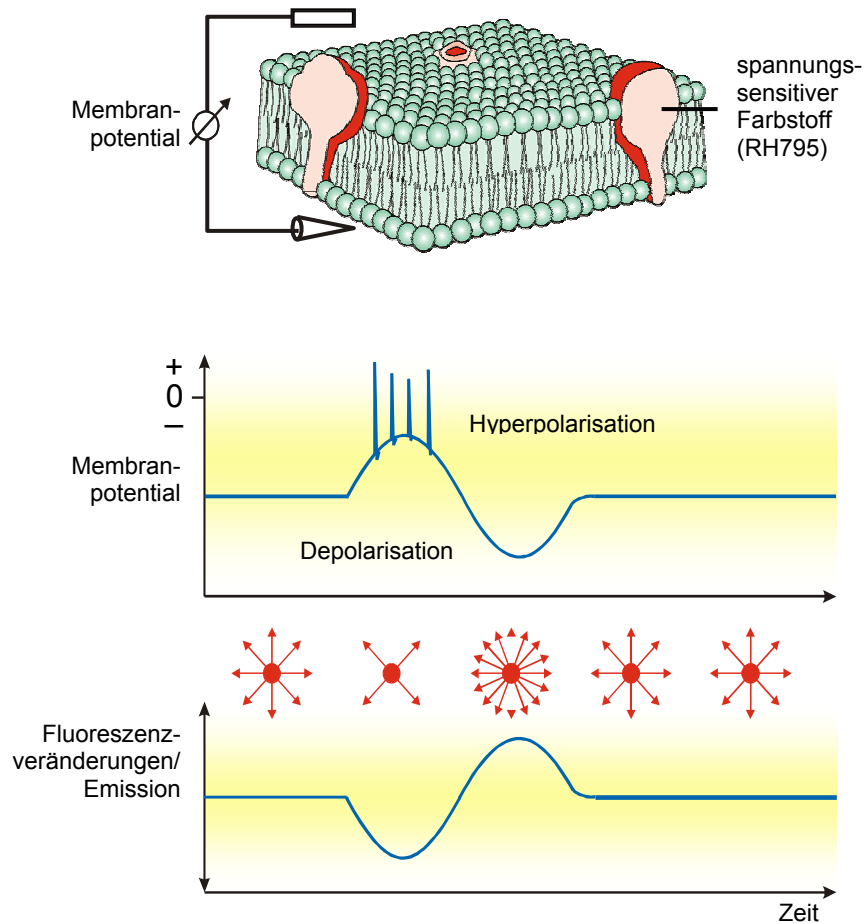
**Abbildung 2.** Entstehung des dreischichtigen Mikrosulcus im Kälteläsionsmodell (modifiziert nach Zilles et al., 1998). Die am Tag der Geburt (P0) induzierte Kälteläsion führt zu einem Verlust der bereits angelegten, tiefen kortikalen Schichten (IV bis VIb). In den folgenden postnatalen Tagen (P1-P3) wandern Neurone mit Zugehörigkeit zu den Schichten I bis III in den Kortex ein (vertikale Pfeile) und bewirken die Einfaltung des dysplastischen Gewebes (bogenförmige Pfeile). Als Folge davon zeigt sich im adulten Hirn (P90) die Formation eines dreischichtigen Mikrosulcus (1 bis 3).

experimentellen kortikalen Dysplasien, stellt die Methode nach Dvorak und Feit ein ideales Tiermodell dar, die funktionellen Konsequenzen fokaler kortikaler Malformationen zu untersuchen.

Studien zeigten, dass die funktionellen Störungen in diesem Modell weit über den dysplastischen Kortex hinausgehen und auch im umgebenden strukturell intakten Kortex ausgeprägte Änderungen der kortikalen Erregbarkeit bestehen (Quill et al. 2002). Im peridysplastischen Kortex konnte eine Übererregbarkeit mit lang anhaltenden multiphasischen Feldpotentialableitungen nachgewiesen werden (Hablitz und DeFazio 1998; Jacobs et al. 1996; Jacobs et al. 1999; Redecker et al. 1998), die große Ähnlichkeiten mit epileptiformer Aktivität aufwies, wie sie in Modellen chronischer Epilepsie gefunden wurde (Prince und Tseng 1993). Auch klinische Studien an Patienten mit fokalen kortikalen Dysplasien belegten die Bedeutung des strukturell intakten peridysplastischen Kortex für die Entstehung epileptiformer Aktivität (Mattia et al. 1995; Palmini et al. 1995). Analysen der Rezeptoreigenschaften im dysplastischen und strukturell intakten Kortex zeigten darüber hinaus weitreichende Veränderungen in der Verteilung und Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten sowie modifizierte Bindungscharakteristika glutamterger und GABAerger Rezeptoren (Hablitz und Defazio 2000; Luhmann et al. 1998b; Redecker et al. 2000b; Zilles et al. 1998). Sie belegten ein Ungleichgewicht inhibitorischer und exzitatorischer Neurotransmitterfunktionen und erklären so möglicherweise das Auftreten epileptiformer Aktivität im Rahmen fokaler kortikaler Malformationen auf. Des weiteren konnte in neuroanatomischen Untersuchungen eine Störung der Konnektivität nachgewiesen werden, die sowohl kallosale als auch thalamo-kortikale Faserprojektionen beeinträchtigte und zu aberranten Verbindungen im dysplastischen und umgebenden Kortex führte (Giannetti et al. 1999; Rosen et al. 2000). All diese Studien trugen dazu bei, das Ausmaß der funktionellen Störungen zu erkennen und die Pathophysiologie besser zu verstehen. Bezüglich der Hyperexzitabilität standen bisher jedoch genauere Untersuchungen zu Lokalisation und Bedeutung aus.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb, Erregbarkeitsänderungen in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien in höherer räumlicher Auflösung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die neuronale Aktivität im Hirnschnittpräparat mit Hilfe spannungssensitiver

Farbstoffe bestimmt. Diese binden an die Zellmembran von Neuronen, ohne internalisiert zu werden und ändern nur im membrangebundenen Zustand ihre molekulare Konformation mit dem Membranpotential und damit ihre optischen Eigenschaften. Diese Veränderungen laufen innerhalb von Mikrosekunden ab (Abb. 3). Die Registrierung der optischen Signale erfolgt mit Hilfe eines Photodiodenarrays mit 464 Kanälen, wobei eine Photodiode bei einer 10fachen mikroskopischen Vergrößerung ein kortikales Areal von  $0.004 \text{ mm}^2$  erfasst. Diese hohe räumliche Auflösung bietet damit die Möglichkeit, die Erregbarkeit kleiner Neuronengruppen zu erfassen und erlaubt eine genauere Auswertung hinsichtlich der Erregungsausbreitung. Feldpotentiale hingegen liegen als Potentialdifferenzen im extrazellulären Raum vor, die komplexe Entstehungsmechanismen haben (Speckmann und Walden 1991), und sind dadurch in ihrer räumlichen Auflösung den optischen Messungen unterlegen. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit zusammen mit einer immunhistochemischen Aufarbeitung der untersuchten Hirnschnittpräparate eine areal- und schichtorientierte Analyse der veränderten neuronalen Erregbarkeit erfolgen.



**Abbildung 3.** Wirkungsweise spannungssensitiver Farbstoffe. Der obere Bildteil zeigt die schematische Darstellung einer neuronalen Zellmembran, in die der spannungssensitive Farbstoff RH 795 integriert ist. Da spannungssensitive Farbstoffe nur im membrangebundenen Zustand spannungsempfindlich sind, erfassen sie ausschließlich Veränderungen des Membranpotentials. Im angeregten Zustand ändern sie ihre molekularen Eigenschaften innerhalb von Mikrosekunden in einem weiten Bereich linear zum Membranpotential. Wie in den beiden Diagrammen des unteren Bildteils dargestellt, beruht der spannungsempfindliche Effekt dabei auf einer Veränderung der Fluoreszenzausbeute. Depolarisiert die Zellmembran, so vermindert sich die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes, bei einer Hyperpolarisation steigt sie an.

### **III. Ziele der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Pathophysiologie fokaler kortikaler Malformationen zu untersuchen. Das Ausmaß der Texturstörung mit ihren funktionellen Auswirkungen und die Mechanismen der Epileptogenese sollten genauer charakterisiert werden. Insbesondere die Rolle der peridysplastischen Zone lag im Zentrum des Studieninteresses. Dazu wurden mit spannungssensitiven Farbstoffen im Hirnschnittpräparat Untersuchungen zur neuronalen Erregbarkeit im dysplastischen und peridysplastischen Kortex durchgeführt, die mit dem entsprechenden Hinterpfoten- und parietalen Kortex bei Kontrolltieren verglichen wurden. Veränderungen der Erregbarkeit und deren laminäres Muster sollten im Bereich fokaler kortikaler Malformationen präzise lokalisiert werden und letztendlich weiteren Aufschluss über die Konsequenzen der kortikalen Störungen geben.



## **IV. Material und Methoden**

### **1. Induktion der Kälteläsion**

#### **1.1 Versuchstiere**

Bei neugeborenen Wistar-Ratten ( $n = 10$ ; 7 Männchen und 3 Weibchen) wurde innerhalb von 4 - 12 Stunden *post partum* modifiziert nach Dvorak und Feit (Dvorak und Feit 1977) eine Kälteläsion induziert (Abb. 2). Die Tiere stammten aus drei Würfen verschiedener Muttertiere von je 10 - 12 Jungen und hatten ein Körpergewicht von  $300 \pm 90$  g.

Die Haltung erfolgte unter konstanten, spezifisch keimfreien Bedingungen („specific pathogen free“), bei einer Raumtemperatur von 22 - 24°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 – 80%, einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden und Nahrung *ad libitum*.

#### **1.2 Anästhesie**

Zur Induktion der Kälteläsion wurden die Tiere mit Hypothermie anästhesiert. Die neugeborenen Ratten wurden in eine mit Eis gefüllte Nierenschale gebettet, wodurch nach 2 – 4 min eine tiefe Anästhesie erreicht wurde. Für die Dauer des nachfolgenden Eingriffs verblieben die Tiere in dieser Lage.

#### **1.3 Induktion der Kälteläsion**

Nach lokaler Desinfektion und longitudinaler Inzision der Kopfschwarte, wurde das Schädeldach der anästhesierten Ratten freigelegt. Ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter Kupferzylinder (Durchmesser: 1 mm) wurde dann für 8 s auf den Schädel über dem fronto-parietalen Kortex gesetzt. Parallel zur Mittellinie wurden drei identische Kälteläsionen in einem Abstand von etwa 1,5 mm platziert, wodurch sich eine 3 – 4 mm lange Läsion in rostro-kaudaler Richtung ergab. Anschließend wurde die Haut mit Histoacryl–Gewebelebstoff (Braun-Dexon, Melsungen) verschlossen. Die Tiere konnten daraufhin 5 – 10 min unter einer Rotlichtlampe von der Narkose erwachen und wurden dann zum Muttertier zurückgesetzt. Die scheinoperierten Kontrolltiere ( $n = 7$ ; 3 Männchen und 4 Weibchen) wurden in gleicher Weise behandelt, jedoch ohne Kühlung des Kupferzylinders. Bis zu den elektrophysiologischen Messungen wurden die Tiere wieder in die Standardtierhaltung zurückgebracht.

## 2. Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten sowohl bei der Experimental- als auch bei der Kontrollgruppe im Alter von 10 – 16 Wochen. Zu diesem Zweck wurden koronare, 500 µm dicke neokortikale Hirnschnitte angefertigt.

### 2.1 Anfertigung der Hirnschnittpräparate

Die erwachsenen Ratten wurden mit Diethylether tief anästhesiert, dekapitiert und der Schädel in folgender Weise vorsichtig eröffnet. Das Kopffell wurde zunächst mit einem Skalpell in sagittaler Richtung durchtrennt und die Temporalmuskel vom Schädelknochen teilweise abpräpariert. Ausgehend vom Foramen magnum wurde dann die Okzipitalschuppe mit einer Pinzette entfernt und der Schädelknochen beidseitig in frontaler Richtung durchtrennt, bis das Schädeldach abgehoben werden konnte. Anschließend erfolgte die Präparation des Gehirns. Hierzu wurde die Dura mater mit Mikropinzette und Mikroschere von der Hirnoberfläche entfernt und das Gehirn mit einem gebogenen Spatel behutsam aus der Schädelgrube gehoben. Die Gefäß- und Nervenstränge wurden durchtrennt und das Gehirn für eine Minute in gekühlte (ca. 4°C) artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, in mM: 124 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.24 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> und 10 Glukose; pH: 7.35 -7.45) überführt, die mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast wurde. Die Dauer der Präparation betrug 2 – 2.5 min.

Die Hemisphären wurden daraufhin mit einer Rasierklinge makroskopisch gespalten und Frontal- und Parietalkortex *en bloc* (Bregma 0 bis -4 mm) vom Restgewebe getrennt. Der gewonnene Gewebeblock wurde dann an seiner dorsalen Seite mit Histoacryl-Gewebeklebstoff (Braun-Dexon, Melsungen) am Boden einer Vibratomschale fixiert, die während des nachfolgenden Schneidevorgangs mit oxygenierter und eisgekühlter ACSF gefüllt war. Anschließend wurden mit einem Vibratom (TSE Systems, Bad Homburg) 500 µm dicke koronare Schnitte hergestellt.

Die Schnitte wurden dann in einer Inkubationskammer mit oxygenierter und temperierter (29 ± 0.5°C) ACSF für eine Stunde aufbewahrt. Danach erfolgte

unter Lichtabschluß die Inkubation mit dem spannungssensitiven Farbstoff RH795 (12,5 g/ml in ACSF-Lösung; Mo Bi Tec, Göttingen). Die Färbekammer war auf einer rotierenden Plattform befestigt und wurde für den einstündigen Färbevorgang mit Carbogen begast. Vor der Überführung in die Messkammer wurde der nichtgebundene Farbstoff für 60 min in reiner ACSF ausgewaschen.

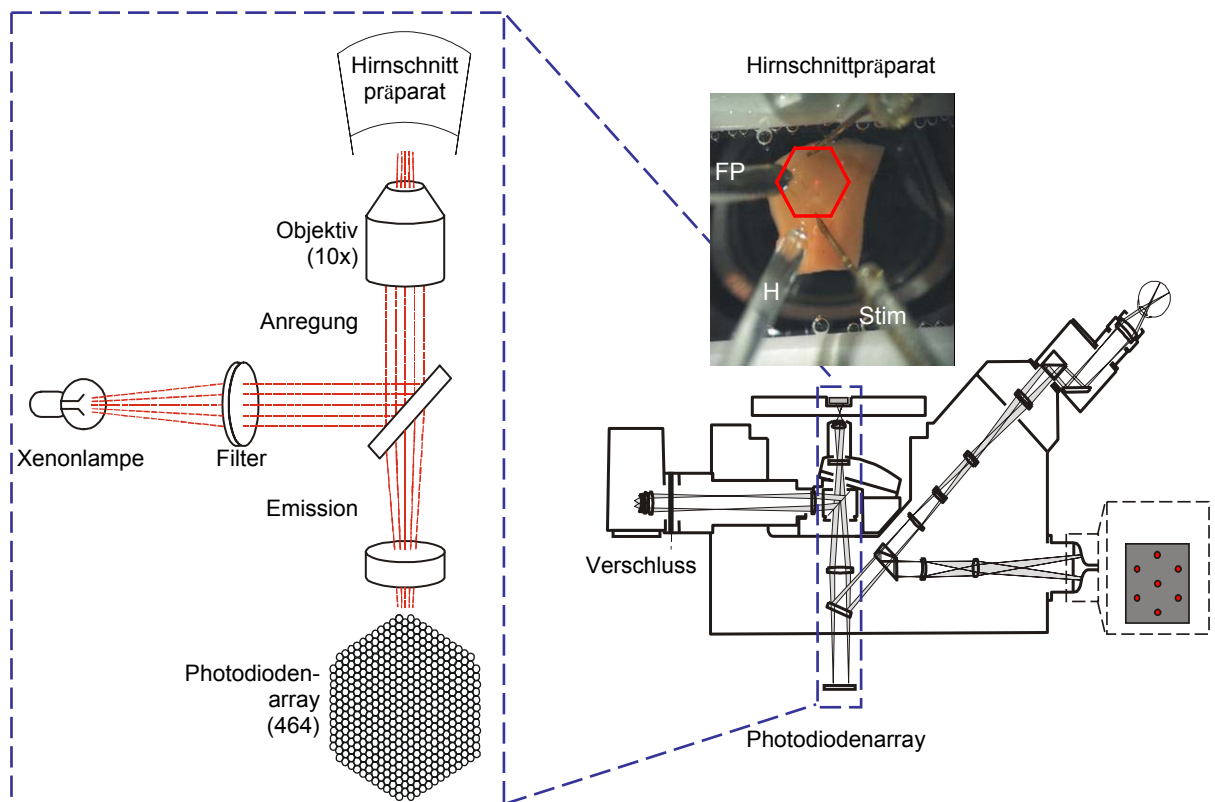
## 2.2 Versuchsaufbau

Das Hirnschnittpräparat wurde mit einer großlumigen, stumpfrandigen Pipette in eine ACSF-perfundierte Untersuchungskammer („submerged chamber“) eingetaucht und mit zwei Halteelektroden fixiert. Die Perfusionskammer war nach dem so genannten „submerge“-Prinzip so konzipiert, dass der Hirnschnitt kontinuierlich von allen Seiten umspült wurde (Haas et al. 1979). Die ACSF-Zufuhr erfolgte seitlich über ein Schlauchsystem mit einer Flussrate von  $80 \pm 10$  ml/min, wobei die Temperatur während der Messungen über einen rückgekoppelten Regelkreis bei  $31 \pm 0.5^\circ\text{C}$  und der pH bei 7.4 konstant gehalten wurden. Die synchron zu den optischen Signalen registrierten Feldpotentiale wurden mit niederohmigen Mikropipetten (1 – 4 M $\Omega$ ) aus Borosilikatglas aufgezeichnet. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden sie mit ACSF gefüllt und manuell mit Hilfe von Mikromanipulatoren in Schicht II/III platziert.

Eine bipolare Stimulationselektrode wurde in Schicht VI positioniert. Die Stimuli bestanden aus biphasischen Rechteckströmen von 100  $\mu\text{s}$  Dauer, die in abnehmender Intensität appliziert wurden.

Das Licht einer Xenonlampe (XBO 75 W, Carl Zeiss, Jena) wurde für 4 s durch einen ca. 500 nm Interferenzfilter und ein 10fach vergrößerndes Objektiv auf den Hirnschnitt geworfen, so dass die Farbstoffmoleküle während der Messungen bei der Wellenlänge ihrer maximalen Absorption angeregt wurden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde dann auf ein hochauflösendes Photodiodenarray (Durchmesser bei 10x Vergrößerung: 1.75 mm, 464 Dioden, 800 Bilder/s) projiziert (Abb. 4). Jede Diode erfasste dabei die Fluoreszenzänderungen in einem Areal von  $63 \times 63 \mu\text{m}$  (0.004 mm<sup>2</sup>) des Hirnschnittes. Zur Orientierung auf dem Hirnschnittpräparat selbst dienten fünf Licht-emittierende Dioden, die die Ecken des hexagonalen Arrays markierten. Durch Projektion dieser Dioden auf die Präparation bot sich eine klare optische

Referenz zu dem gemessenen Areal. Mit Hilfe einer über der Versuchsanordnung montierten digitalen Kamera (Canon EOS D30, Canon U.S.A. Inc., Lake Success, NY) wurden die jeweiligen Messeinstellungen exakt dokumentiert und gespeichert. Die Signale der Photodioden wurden parallel 200fach verstärkt, gefiltert und mit einer zeitlichen Auflösung von 800 Bildern/s digitalisiert. Die Auswertung der digitalisierten Signale erfolgte mit NeuroPlex<sup>®</sup> Software (RedShirtImaging, LLC, Fairfield, CT). Dieses Programm erlaubt eine quantitative Bestimmung von Amplitude und Latenz für jede einzelne Photodiode. Zudem kann eine qualitative Aussage über die zeitlich-räumlichen Merkmale der evozierten Potentiale getroffen werden.



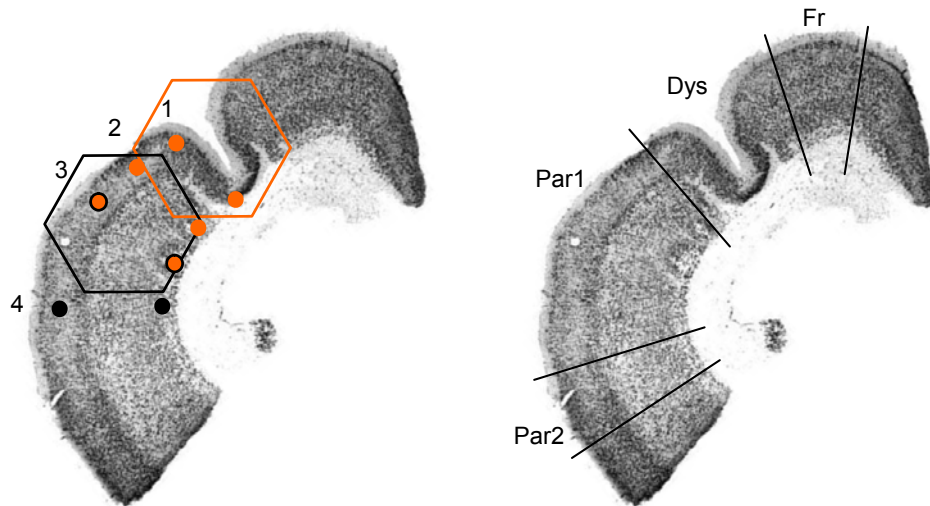
**Abbildung 4.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. In der rechten Bildhälfte ist ein Querschnitt durch die Versuchsanordnung abgebildet. Das mit spannungssensitiven Farbstoffen inkubierte Hirnschnittpräparat wird in der ACSF-perfundierten Messkammer auf der Plattform des Lichtmikroskops (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena) platziert. Die eingeblendete Fotografie zeigt eine Übersichtsaufnahme dieser Messkammer mit Hirnschnittpräparat und bereits positionierter Feldpotential- (FP), Halte- (H) und Stimulationselektrode (Stim). Die Begrenzungen des hexagonalen Messbereichs (rotes Sechseck), sind mit roten Lichtpunkten markiert, die von Licht-emittierenden Dioden (seitlicher Kasten am Mikroskop) auf den Hirnschnitt projiziert werden. Zur Registrierung der optischen Signale wird, wie in der linken Bildhälfte dargestellt, Licht einer Xenonlampe durch einen Interferenzfilter (ca. 500 nm) und ein 10x Objektiv auf den fluoreszenzmarkierten Hirnschnitt geworfen. Durch die optische Vergrößerung können die spannungssensitiven Farbstoffe eines Areals von  $63 \times 63 \mu\text{m}$  angeregt werden und das emittierte Fluoreszenzlicht wird auf ein Photodiodenarray mit 464 Elementen projiziert.

### 2.3 Versuchsablauf

Nach einer einstündigen Äquilibration der Hirnschnittpräparate in der Messkammer, erfolgten die elektrophysiologischen Untersuchungen nach folgendem Schema. Zunächst wurde das Photodiodenarray 1 mm paramedian über dem dysplastischen bzw. bei Kontrolltieren über dem Hinterpfotenkortex positioniert. Die Feldpotentialelektrode wurde zwischen dem Hinterpfotenareal (HL) und dem parietalen Kortex (Par1) in Schicht II/III eingesetzt. Die Stimulationselektrode wurde senkrecht zur pialen Oberfläche in Schicht VI so angeordnet, dass der Messbereich beiderseits der Elektrode etwa gleich groß war (Abb. 5).

Die Registrierung der evozierten Potentiale wurde vor jeder Stimulation durch einen Triggerimpuls aus dem Reizgerät gestartet und das optische Signal über 1300 ms aufgezeichnet und digital gespeichert. Die Reizintensität wurde von 100 V über 10 V auf 6 V schrittweise reduziert. Bei der Beurteilung der Reizintensität ist zu berücksichtigen, dass durch das Superfusat Reizschlußströme flossen und somit die effektive Reizintensität erheblich niedriger war. Zwischen den Reizen wurde eine Pause von einer Minute eingehalten, wodurch phototoxische Effekte und ein frühzeitiges Ausbleichen der Hirnschnittpräparate weitgehend verhindert wurden.

Die Reizelektrode wurde ausgehend von der oben beschriebenen Position nach jeder Messung um 1 mm in lateraler Richtung versetzt, während die Position des Photodiodenarrays zunächst nicht verändert wurde. In dieser Weise wurden drei Messreihen durchlaufen. Das Array wurde dann  $0,9 \pm 0,1$  mm nach lateral über den parietalen Kortex (Par1) verschoben. Es folgten zwei weitere Stimulationszyklen in oben beschriebener Weise, wobei die Reizelektrode zunächst an ihrer letzten Position verblieb und abschließend erneut um 1 mm nach lateral versetzt wurde (Abb. 5).



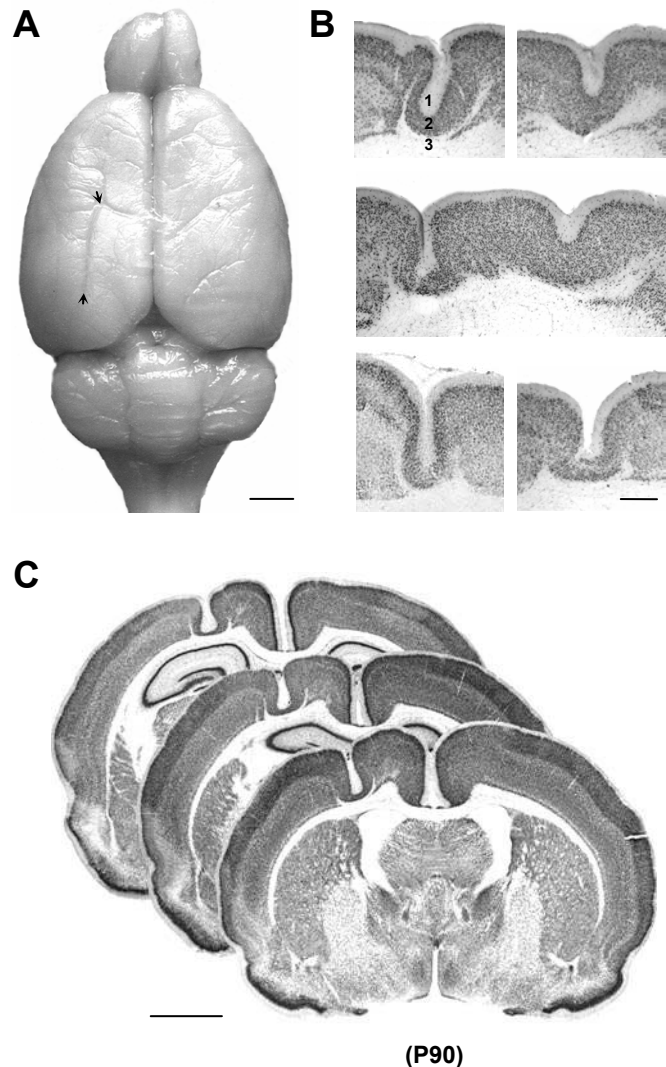
**Abbildung 5.** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Die linke Bildhälfte zeigt ein immunhistochemisch gefärbtes Hirnschnittpräparat, auf dem die verschiedenen Messpositionen kartiert sind. Die zugehörigen zytoarchitektonischen Areale sind rechtsseitig vom Frontalen (Fr) bis zum sekundären parietalen Kortex (Par2) dargestellt. Das Photodiodenarray wurde zunächst über dem dysplastischen Kortex (Dys) positioniert (orangefarbenes Hexagon), die Feldpotentialelektrode in Schicht II/III und die Stimulationselektrode in Schicht VI platziert (orangefarbene Punkte). Nach Registrierung der optischen Signale wurden Feldpotential- und Reizelektrode zweimal nach lateral verschoben. An dritter Elektrodenposition (schwarz eingefasste Punkte) wurde das Array über den primären parietalen Kortex (Par1) gesetzt und die neuronale Aktivität in dieser Konstellation aufgezeichnet (schwarzes Hexagon). Die abschließende Messung erfolgte nach Umsetzung der Elektroden in lateraler Richtung (schwarze Punkte) bei unveränderter Arrayposition.

### 3. Morphologische Aufarbeitung der Hirnschnittpräparate

Im Anschluss an die *in vitro* Messungen wurden die Präparate mit 4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure in einer Phosphatpufferlösung (0.15 M) bei einem pH von 7.4 und einer Temperatur von 4°C fixiert. Die Hirnschnitte wurden dann für 3 – 12 Stunden in 10%iger und für 24 – 48 Stunden in 30%iger Saccharose in 0.1 M PBS gehärtet. Zur Darstellung der kortikalen Schichtung und der induzierten Läsionen, wurden histologische und immunhistochemische Färbetechniken verwendet (Abb. 6).

#### 3.1 Histologische Färbung

Die Hirne wurden bei Raumtemperatur in 0.1 M Zitratpuffer, pH 4.5, über Nacht inkubiert und anschließend mit Mikrowellen (650 W, 135 s) bestrahlt. Das Gewebe wurde dann mit einem Gefrierschlittenmikrotom (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) in 50 µm-dicke Schnitte geteilt und in



**Abbildung 6.** Kälteläsionsinduzierte kortikale Malformation bei der Ratte. **A:** Aufsicht auf ein perfusionsfixiertes adultes Rattenhirn mit unilateraler kortikaler Malformation. **B:** Variabilität der Malformationen. Immunhistochemisch (NeuN) gefärbte, koronare Hirnschnitte durch die kortikale Dysplasie von fünf Tieren der Experimentalgruppe. Ein Tier zeigt zwei benachbarte Läsionen. Die kortikale Dysplasie ist typischerweise charakterisiert durch einen Verlust der unteren kortikalen Schichten mit resultierender Formation eines Mikrosulcus. Der dreischichtige Kortex ist mit arabischen Nummern beschriftet. **C:** Photomontage von drei Kresyl-Violett gefärbten, koronaren Hirnschnitten durch die kortikale Dysplasie. Die Eichbalken repräsentieren 2 mm (A, C) bzw. 500 µm (B).

eisgekühlter PBS (0.1 M) aufgefangen. Jeder zweite Schnitt wurde mit Kresyl-Violett nach einem Standardverfahren gefärbt, der andere für die immunhistochemische Färbung verwendet.

### **3.2 Immunhistochemische Färbung**

Zur Bestimmung der zytoarchitektonischen Areale und der kortikalen Schichten wurde ergänzend zur Histologie eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker Neu-N („neuronal nuclei antigen“) verwendet. Die Antikörper richteten sich dabei spezifisch gegen ein Antigen auf den Zellkernen von Neuronen und stellen die einzelnen kortikalen Laminae so dar, dass eine eindeutige zytoarchitektonische Zuordnung erfolgen konnte. Das Gewebe wurde zunächst dreimal in Tris-Puffer (Trissalz, pH 7.4 und 0.05% Triton-X 100) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung mit Tris-Puffer von 1:500 inkubiert. Die Schnitte wurden danach erneut dreimal gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (goat-anti-mouse-AK) in einer Verdünnung mit Tris-Puffer von 1:300 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem Waschen wurden die Schnitte für 30 min in eine Avidin-Biotin-Peroxidase-Lösung (AB-Reagenz, Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) überführt. Die Schnitte wurden abermals gewaschen und in Diaminobenzidin-Hydrochlorid (DAB, Sigma, St. Louis, MO) in einer Verdünnung mit Tris-Puffer (pH 7,7) von 1:100 platziert. Unter Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Peroxidasereaktion gestartet, bei der DAB oxidiert und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert wird und als Reaktionsprodukt ein dunkelbraunes, amorphes, in Alkohol und Wasser unlösliches Phenazinpolymer entsteht. Die so bearbeiteten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 70%, 96%, 100%) dehydriert, gewaschen und mit Toluol eingedeckt (Entellan<sup>®</sup>; Merck, Darmstadt). Nach einer Trocknungszeit von ca. 24 Stunden konnten die Schnitte ausgewertet werden.

## **4. Auswertung und Statistik**

### **4.1 Zuordnung der optischen Signale**

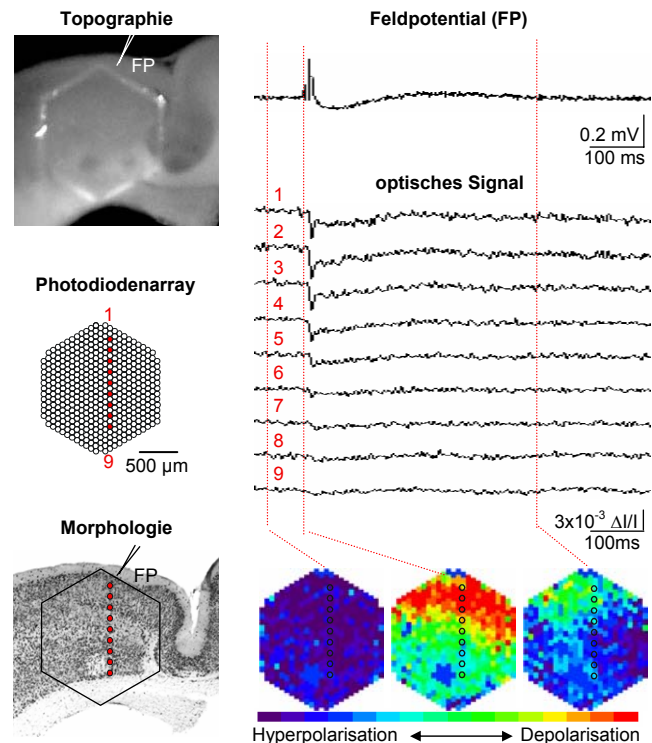
Die gefärbten Hirnschnitte wurden durch ein Lichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena) mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Carl Zeiss, Jena)



aufgenommen und mit einem Imaging-Programm (AxioVision 2.05®, Carl Zeiss, Jena) bearbeitet und gespeichert. Die morphologischen Bilder wurden dann mit Hilfe eines anatomischen Atlanten (Zilles K. 1992; Zilles K. und Wree A. 1995) in zytoarchitektonische Areale und kortikale Schichten gegliedert. Zusammen mit den Bildern, die während der elektrophysiologischen Messungen aufgenommen wurden, konnten nun die dokumentierten Arraypositionen auf die morphologischen Strukturen der Hirnschnitte projiziert werden und anschließend die Position einzelner Dioden in den kortikalen Schichten genau bestimmt werden (Abb. 7). Diese Zuordnung erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop 5.0® und Adobe PageMaker 6.5® (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

#### 4.2 Bestimmung der Untersuchungsparameter

Zur Charakterisierung der optischen Signale wurden folgende Parameter bestimmt: 1.) die maximale Amplitude der evozierten Potentiale, 2.) ihre Latenz und 3.) ihre Amplitude zu



**Abbildung 7.** Registrierung der optischen Signale im peripylarischen Kortex. In der linken Bildhälfte ist das räumliche Verhältnis der optischen Registrierung mit der zugrunde liegenden Histologie dargestellt. Die Fotografie oben (Topographie) zeigt ein Hirnschnittpräparat in der Messkammer, auf das die hexagonale Begrenzung des Photodiodenarrays projiziert wurde. Darunter ist die Konfiguration des Photodiodenarrays schematisch dargestellt. Die immunhistochemische Färbung (NeuN) desselben Hirnschnittes, der oben in der Messkammer abgebildet ist, schließt sich unten an (Morphologie). Die Position des Photodiodenarrays wurde auf dem histochemisch gefärbten Hirnschnitt rekonstruiert und mit einem Hexagon markiert. Ebenso wurde die Position der Feldpotentialelektrode (FP) verzeichnet. Trotz leichter Veränderung des Hirnschnittpräparates während der histologischen Verarbeitung, sichert dieses Verfahren eine gute Korrelation von optischem Signal und zugrunde liegender Morphologie. Dies ist z.B. an der Lage der Malformation im Verhältnis zum Photodiodenarray erkennbar, die im topographischen und morphologischen Bild eine hohe Übereinstimmung aufweist. Die rechte Bildseite zeigt oben das Feldpotential, das unmittelbar benachbart zum Photodiodenarray registriert wurde (s. Topographie). Die korrespondierenden Fluoreszenzänderungen (optisches Signal) sind darunter zum einen als Spuren von 9 Photodioden, die den rot markierten Photodioden in der linken Bildhälfte entsprechen, dargestellt und zum anderen als farbkodierte Bilder zu drei verschiedenen Zeitpunkten der optischen Registrierung abgebildet (rote Markierung).

definierten Zeitpunkten (10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 ms *post stimulus*). Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte in jeweils drei unterschiedlichen Reizstärken (100 V, 10 V und 6 V), an schichtspezifisch ausgewählten Dioden. Die Signale vier benachbarter Dioden wurde hierbei gemittelt und die Ergebnisse als  $MW \pm SEM$  angegeben.

Die im Folgenden beschriebene Diodenauswahl wurde an den morphologischen Bildern, auf die zuvor das Photodiodenarray projiziert worden war, getroffen. Im dysplastischen Kortex wurden Dioden medial und lateral der Läsion so gewählt, dass oberflächlich, tief oder am Boden der Läsion gelegene Neuronengruppen erfasst wurden. Im strukturell intakten Kortex wurden Dioden in Schicht III und VI aufgesucht, die lotrecht zur Kortexoberfläche (kolumnär) angeordnet waren. Den Ausgangspunkt bildete hierbei eine kortikale Kolumne von Neuronen, die sich oberhalb der Stimulationselektrode befand. Medial und lateral davon wurden in einem Abstand von  $0.8 \pm 0.1$  mm in gleicher Weise weitere Dioden bestimmt. Jede Kolumne wurde in Abhängigkeit von ihrer Entfernung zur Stimulationselektrode mit Ziffern von 0 bis  $\pm 2$  benannt. Die Position 0 entsprach dabei der lotrecht über der Reizelektrode gelegenen kortikalen Kolumne, die Position +1 oder -1 schloss sich medial bzw. lateral daran an (Abb. 8 A, S 29).

Die weitere Auswertung erfolgte computergestützt mit NeuroPlex<sup>®</sup> Software und Microsoft Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation). NeuroPlex<sup>®</sup> kann sowohl die Signale einzelner Dioden („trace display“) als auch die des gesamten Diodenbereichs („page display“) darstellen. So konnten die zuvor auf den morphologischen Schnitten ausgewählten Dioden den gespeicherten Signalen im „page display“ genau zugeordnet werden. Die Rohdaten dieser Signale wurden in ASCII-Dateien umgewandelt, aus denen in Microsoft Excel<sup>®</sup> die oben genannten Untersuchungsparameter berechnet werden konnten.

### 4.3 Statistik

Bei der quantitativen Auswertung wurden die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad InStat 3.0<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, CA) und Microsoft Excel 4.1<sup>®</sup> unter Verwendung folgender Tests: 1.) Einfaktorielle Varianzanalyse

(ANOVA: „Analysis Of Variance“) mit post-hoc Bonferroni-Korrektur und 2.) Ungepaarter t-Test. Der Vergleich der Resultate zwischen Test- und Kontrollgruppe erfolgte arealspezifisch. Die Ergebnisse aus der parietalen Kortexregion der Experimentalgruppe wurden den Ergebnissen aus der gleichen Region der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Der dysplastische Kortex der Testgruppe wurde mit Schicht III des HL-Areals in der Kontrollgruppe verglichen.

## **V. Ergebnisse**

### **1. Morphologie und Lokalisation der kortikalen Läsionen**

Bei allen Tieren, bei denen am Tag der Geburt eine Gefrierläsion induziert wurde ( $n = 10$ ), war eine typische kortikale Malformation nachweisbar, die sich auf das Vorderpfoten- (FL) und Hinterpfotenareal (HL), sowie auf den sekundären okzipitalen Kortex (Oc2) erstreckte (Zilles K. 1992). Im Bereich der Malformation zeigte sich ein Verlust der tiefen Kortexschichten und eine Einfaltung der oberflächlichen kortikalen Schichten, wodurch ein Mikrosulcus entstand, der nur noch drei bis vier Schichten erkennen ließ (Jacobs et al. 1996). Die subpiale Schicht, die den Mikrosulcus auskleidete, glich Schicht I des Neokortex; die darunter gelegene entsprach den Schichten II/III. Den Abschluss in der Tiefe bildete meist eine zellarme Schicht (Abb. 6, S. 21). Die Texturstörung dehnte sich  $1.0 \pm 0.2$  mm nach lateral aus und durchzog den gesamten Kortex, wobei das angrenzende Corpus Callosum und tiefer gelegene Strukturen nicht beeinträchtigt wurden. Bei einigen Tieren ( $n = 3$ ) waren die infragranulären Anteile der Schicht VI noch erhalten. In einzelnen Fällen ( $n = 2$ ) wies die obere, zellarme Schicht des *Mikrosulcus* Ansammlungen ektooper, neuronaler Zellen auf. Ein Tier zeigte zusätzlich eine zweite, im frontalen Kortex gelegene Malformation. In der Umgebung der Dysplasie waren strukturell keine Veränderungen im Vergleich zum Kontrollgewebe erkennbar. Als Kontrollen dienten 7 scheinoperierte Tiere. Alle Tiere dieser Gruppe zeigten weder im Kortex noch in subkortikalen Hirnregionen Anzeichen einer strukturellen Schädigung.

### **2. Erregbarkeitsänderungen im peridysplastischen Kortex**

Die elektrophysiologischen Messungen wurden insgesamt an 11 Schnitten von 9 Tieren mit kortikaler Dysplasie und an 7 Schnitten von 7 Kontrolltieren durchgeführt. Die Position der verwendeten Hirnschnitte variierte von  $-1.8$  mm bis  $-3.3$  mm bezogen auf Bregma. Auf diese Weise wurde der somatosensorische Kortex (peridysplastischer Kortex) in der Umgebung der

Dysplasie bei allen Tieren erfasst. Zur Analyse der optischen Signale wurde eine Erregungsschwelle definiert. Hierzu wurde die durchschnittliche Rauschamplitude der optischen Signale an der Position 0 bestimmt ( $0.2 \pm 0.05 \times 10^{-3} \Delta I/I$ ) und die Signale nur dann ausgewertet, wenn die Amplitude die doppelte Rauschamplitude ( $0.5 \times 10^{-3} \Delta I/I$ ) übertraf.

## 2.1 Eigenschaften der Feldpotentiale und optischen Signale

Im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Feldpotential und optisches Signal synchron registriert. Das Feldpotential zeigte zunächst eine schnelle Komponente mit einer typischen triphasischen Konfiguration, die mit einer Latenz von 4 - 5 ms *post stimulus* einsetzte. Danach trat eine scharfe Positivierung auf, der im weiteren Verlauf zwei Polaritätswechsel folgten. Die Potentialveränderungen erreichten dabei Amplituden von bis zu  $2.0 \pm 0.2$  mV. Die Dauer dieser schnellen Komponente betrug etwa 20 ms. Der nachfolgende langsame Teil des Feldpotentials war durch eine flache Negativierung gekennzeichnet, die über mehrere 100 ms anhielt. Im weiteren Verlauf fiel das Potential allmählich wieder auf die Nulllinie zurück. Die Amplitude des initialen Spike und die Dauer der lang anhaltenden Negativierung waren dabei von der Reizintensität abhängig.

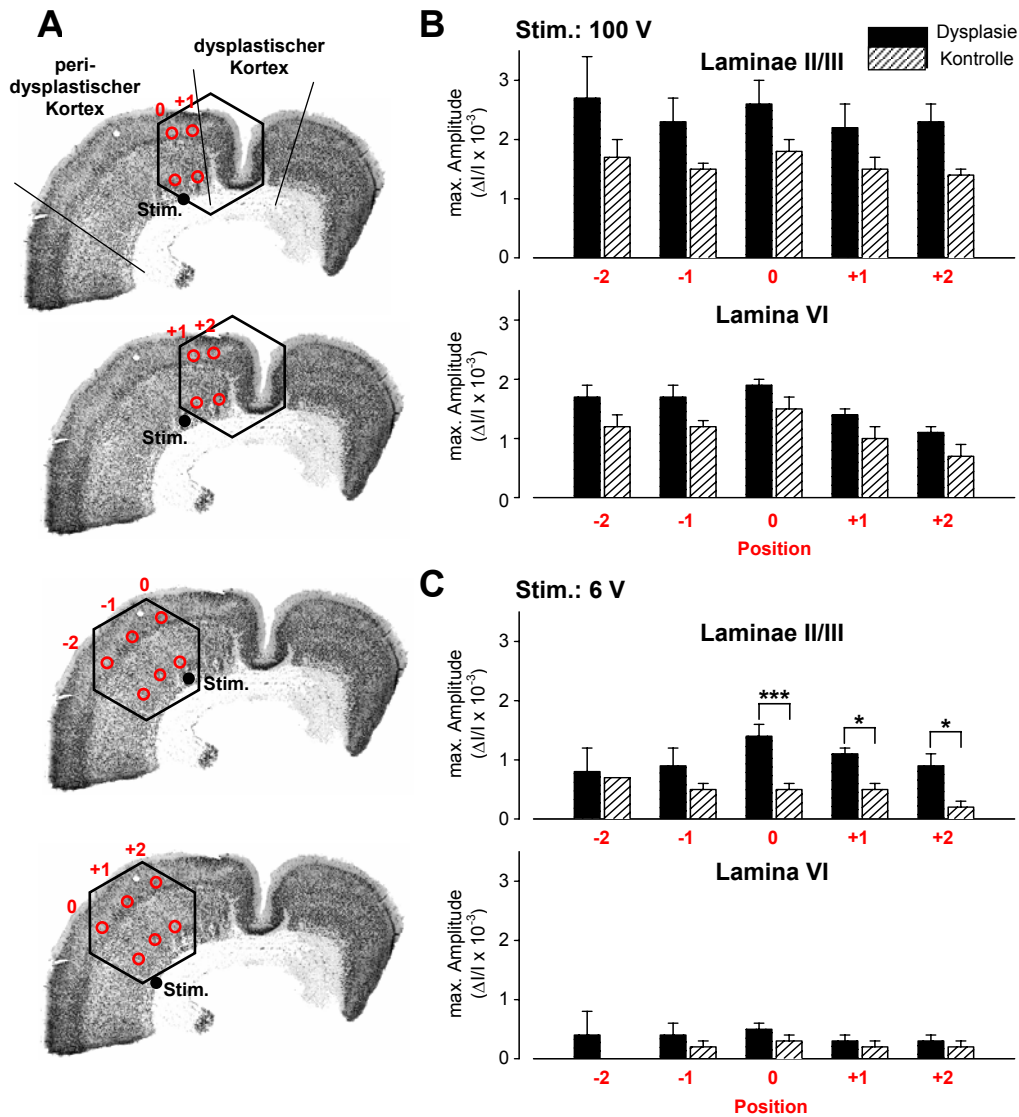
Während das elektrische Signal in Abhängigkeit vom Ableitungsort Hinweise auf Änderungen des Membranpotentials als negatives bzw. positives Potential gibt, spiegelt das optische Signal Membranpotentialdifferenzen aller Neurone, die durch das Diodenarray erfasst werden, als Fluoreszenzänderungen wider. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe werden in die Zellmembran von Neuronen eingebaut und ändern ihre optischen Eigenschaften innerhalb von Mikrosekunden proportional zum Membranpotential (Ross et al. 1974; Salzberg et al. 1973; Salzberg et al. 1993). Ungebundene Farbstoffe reagieren nicht auf Potentialdifferenzen. Die Intensitätsänderungen des Fluoreszenzlichtes werden dabei in Relation zur Grundfluoreszenz ( $\Delta I/I$ ) bestimmt (Abb. 3, S. 13).

Die optischen Signale wiesen eine hohe Übereinstimmung mit den Feldpotentialen auf. Initial trat analog zur scharfen Potentialänderung im elektrischen Signal, eine starke Abnahme des Fluoreszenzsignals auf. Nachfolgend zeigte sich eine Fluoreszenz-Zunahme, das emittierte Licht blieb jedoch unterhalb der Grundfluoreszenz, d.h. die Depolarisation dauerte an.

Dieser Verlauf war teilweise bis zu 1000 ms nachweisbar. Die Charakteristika wurden vor allem in den supragranulären Schichten deutlich. Infragranulär waren die starke Abnahme der Fluoreszenz und die lang anhaltende Fluoreszenzverminderung hingegen weniger stark ausgeprägt (Abb. 7, S. 23).

## **2.2 Amplituden**

Zur Analyse der optischen Signale im peridysplastischen Kortex (Par1), wurden zunächst folgende Amplituden ermittelt: 1.) die maximale Amplitude innerhalb von 100 ms *post stimulus*, 2.) die Amplitude 25 und 50 ms *post stimulus* und 3.) die Amplituden zu definierten Messpunkten im zeitlichen Verlauf (10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 ms *post stimulus*). Die Bestimmungen erfolgten in allen drei Reizintensitäten (100 V, 10 V und 6 V) an jeweils vier Dioden in den Schichten II/III und VI, deren Signale gemittelt wurden. Die ausgewählten Signale wurden je nach ihrer Nähe zur Reizelektrode fünf Positionen (-2, -1, 0, +1 und +2) zugeordnet. Der Abstand zwischen den Positionen betrug jeweils etwa 500 µm (Abb. 8A).



**Abbildung 8.** Auswertung der optischen Signale (A) und Verteilung der maximalen Amplituden im peridysplastischen Kortex (B, C). **A:** schematische Darstellung der Lage der Photodioden, die zur Messung der Amplituden und Latenzen ausgewählt wurden (rote Kreise). Dabei wurden in Abhängigkeit von der Lage zur Stimulationselektrode lateral (-1, -2) und medial (+1, +2) jeweils in den Schichten II/III und VI die interessanten Gebiete im dysplastischen und somatosensorischen Kortex (Par1) bestimmt. Das Hexagon markiert die Position des Photodiodenarrays, der schwarze Punkt die Position der Stimulationselektrode. **B, C:** Darstellung der maximalen Amplituden in Experimental- und Kontrollgruppe in den Laminae II/III und VI nach Stimulation mit 100 V (B) und 6 V (C). Die Amplituden der optischen Signale sind den Messpositionen -2 bis +2 zugeordnet, die nach dem Schema in A benannt wurden. Sie sind als Intensitätsänderungen des Fluoreszenzlichtes in Relation zur Grundfluoreszenz dargestellt ( $\Delta I/I$ ). Tendenziell zeigten sich in den oberen Schichten des peridysplastischen Kortex immer größere Amplituden als im Kontrollgewebe. Signifikante Unterschiede ergaben sich bei einer geringen Stimulationsintensität (C) lotrecht über der Reizelektrode (Position 0) und in den medial angrenzenden Gebieten (Position +1 und +2) in den Schichten II/III. Sie sind mit einem (\*) gekennzeichnet (one-way ANOVA mit post-hoc Bonferroni-Korrektur,  $p < 0.05$ ).

### 2.2.1 Bestimmung der maximalen Amplitude

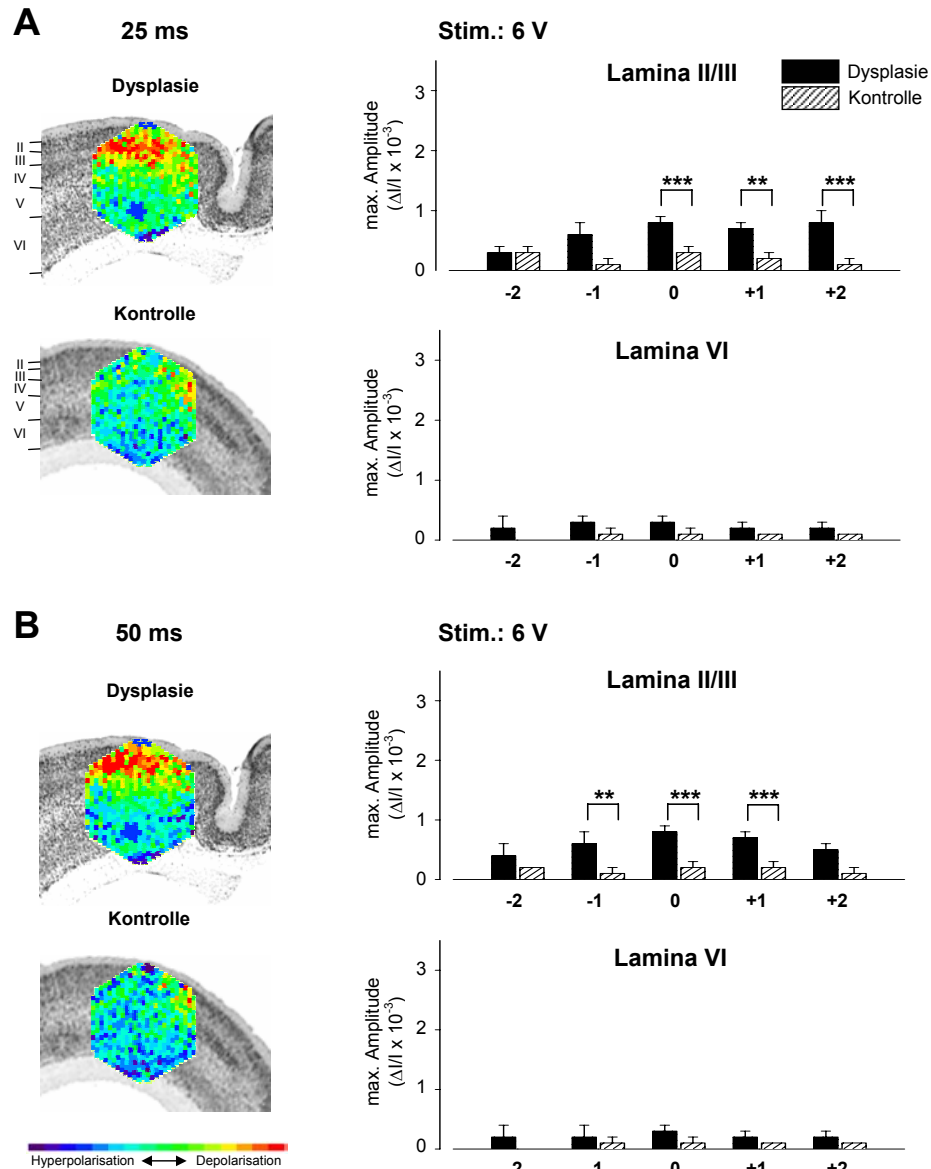
Zunächst zeigte sich sowohl in der Experimental- als auch in der Kontrollgruppe ein leichter Größenunterschied in den Amplituden der Laminae II/III und VI, zugunsten der supragranulären Schichten, der mit abnehmender Reizintensität in der Experimentalgruppe deutlicher wurde. Bei 100 V ergaben sich weder in den supragranulären noch in den infragranulären Schichten signifikante Unterschiede zwischen der Experimental- und Kontrollgruppe, wobei die Amplituden im peridysplastischen Kortex tendenziell größer waren, als die im Kontrollgewebe. In den niedrigen Reizstärken (10 V und 6 V) zeigte sich in den Schichten II/III bei der Experimentalgruppe zunächst eine charakteristische Verteilung der Amplituden auf die Positionen -2 bis +2. Die größten Amplituden waren an Position 0, in nächster Nähe zur Stimulationselektrode, erkennbar. An den lateral bzw. medial zur Reizung gelegenen Positionen (-2, -1, +1, +2) nahmen die Amplituden mit zunehmender Entfernung stetig ab. In Schicht VI, ebenso wie in den Schichten II/III und VI der Kontrollgruppe unterschieden sich die Amplituden nicht sichtbar (Abb. 8 B). Im Gegensatz zur Reizung mit 100 V zeigte sich bei 10 und 6 V ein deutlicher Unterschied zwischen den Amplituden der Laminae II/III im peridysplastischen Kortex und somatosensorischen Kontrollkortex. An Position 0 ergab sich für beide Intensitäten ein signifikanter Unterschied (one-way ANOVA mit post hoc Bonferroni-Korrektur): bei 10 V erreichte die maximale Amplitude hier in der Experimentalgruppe  $1.7 \pm 0.3 \times 10^{-3} \Delta/I$  gegenüber  $0.8 \pm 0.1 \times 10^{-3} \Delta/I$  bei den Kontrollen ( $p < 0.01$ ). Bei 6 V ergab sich eine Differenz von  $1.4 \pm 0.2 \times 10^{-3} \Delta/I$  im peridysplastischen Kortex zu  $0.5 \pm 0.1 \times 10^{-3} \Delta/I$  im Kontrollgewebe ( $p < 0.001$ ). Diese Unterschiede zeigten sich bei 6 V Reizstärke ebenfalls an den Positionen +1 und +2 ( $p < 0.05$ ). In Schicht VI wichen die Amplituden in Experimental- und Kontrollgruppe jedoch nicht voneinander ab (Abb. 8 C).

### 2.2.2 Amplituden 25 und 50 ms *post stimulus*

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Untersuchung der Amplituden 25 und 50 ms *post stimulus*. Die Amplituden waren zu diesen Zeitpunkten im Vergleich zur maximal erreichten Amplitude um 40 bis 50 % reduziert. Während bei 100 V Reizintensität weiterhin kein Unterschied zwischen den Amplituden der Experimental- und Kontrollgruppe erkennbar war, ergaben sich in den niedrigen



Reizstärken nach wie vor deutliche Unterschiede in den Schichten II/III. In Schicht VI waren jedoch auch hier keine Unterschiede nachweisbar. Zunächst waren die Amplituden in Laminae II/III an den Positionen -2 bis +2 ebenfalls so verteilt, dass der größte Ausschlag an Position 0 zu verzeichnen war und die Amplituden zu beiden Seiten kontinuierlich abnahmen. Darüber hinaus zeigte sich bei 10 V Reizintensität 25 ms nach Reizung an den Positionen 0, +1 und +2 ein wesentlicher Unterschied zwischen peridysplastischem Kortex und Kontrollgewebe, der an Position 0 auch noch 50 ms *post stimulus* nachweisbar war ( $p < 0.05$ ). Ähnlich verhielten sich die Amplituden bei 6 V Reizstärke. 25 ms nach Stimulation zeigte sich hier ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied zwischen Experimental- und Kontrollgruppe in den Amplituden senkrecht über der Reizelektrode und den medial angrenzenden Messpositionen (Position 0, +2 mit  $p < 0.001$  und Position +1 mit  $p < 0.01$ ) (Abb. 9 A). 50 ms *post stimulus* waren diese Unterschiede weiterhin an den Positionen -1 ( $p < 0.05$ ), 0 und +1 ( $p < 0.001$ ) nachweisbar (Abb. 9 B).

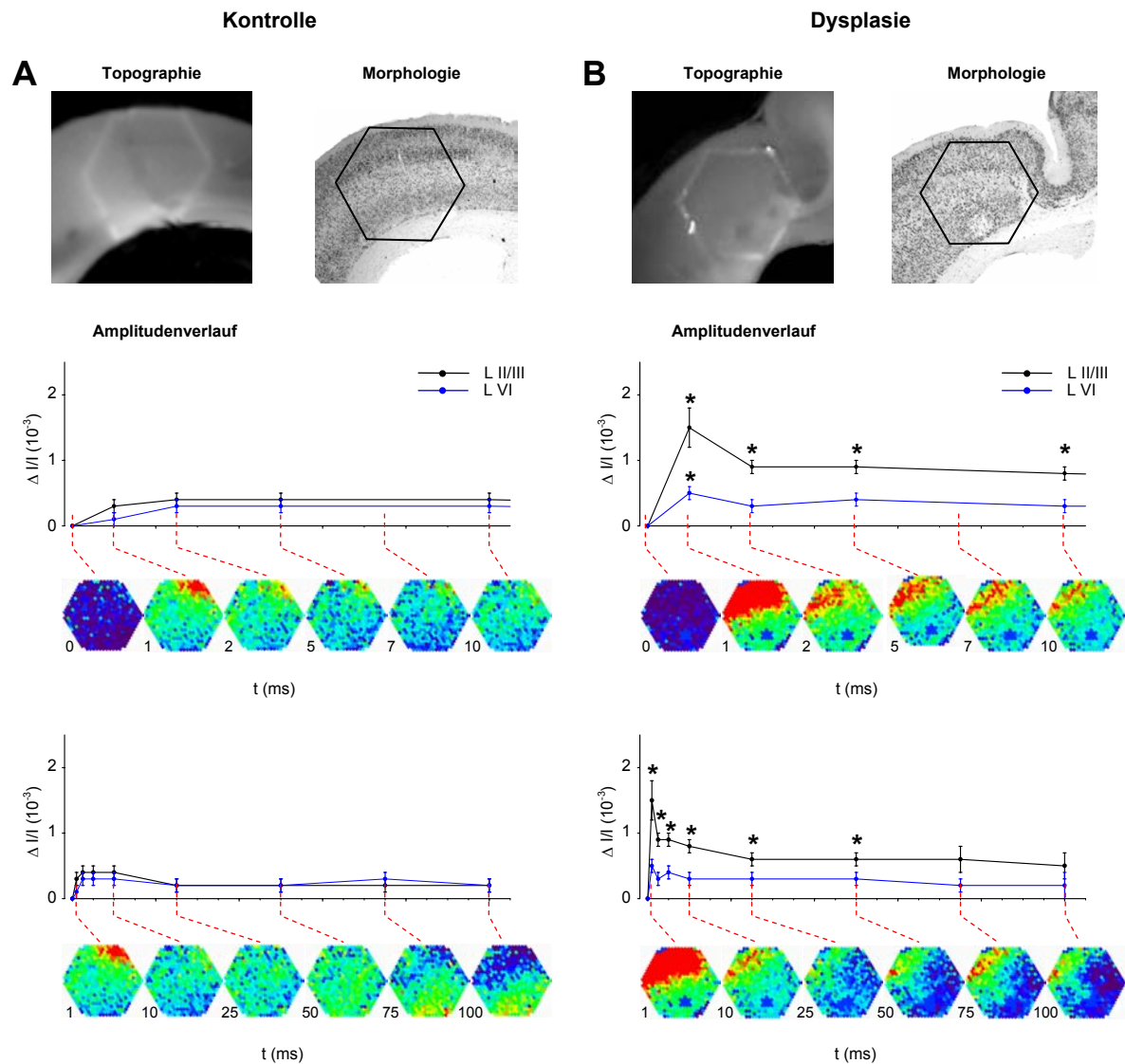


**Abbildung 9.** Übererregbarkeit in der Umgebung kortikaler Malformationen. Die linke Bildhälfte zeigt die Histologie eines Hirnschnittpräparates (NeuN-Färbung) von einem Dysplasie- und Kontrolltier mit einer eingeblendeten farbkodierten Darstellung des optischen Signals 25 ms (A) bzw. 50 ms (B) post stimulus. Die einzelnen kortikalen Schichten sind mit römischen Ziffern benannt. Die zugehörigen Amplituden des optischen Signals sind rechtsseitig in den Balkendiagrammen dargestellt (vgl. Abb. 4). Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich eine deutliche Übererregbarkeit in den Schichten II/III des peridysplastischen Kortex, die im Kontrollgewebe nicht nachgewiesen werden konnte. Die größten Amplituden wurden lotrecht über der Reizelektrode (Position 0) und den angrenzenden Arealen (-1, +1, +2) registriert, wobei die Hyperexzitabilität in der Umgebung der Reizelektrode medial (+1, +2) am stärksten ausgeprägt war. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Bonferroni-Korrektur,  $p < 0.05$ .

### 2.2.3 Zeitlicher Verlauf der optischen Signale

Die Analyse der Amplituden im zeitlichen Verlauf ließ erkennen, dass die zuvor beschriebenen Unterschiede zwischen peridysplastischem Kortex und somatosensorischen Kortex von Kontrolltieren lang anhaltend, nämlich bis zu 500 ms *post stimulus* nachweisbar waren. Bestimmt wurden die Amplituden an der Reizelektroden nahen Position 0 zu definierten Zeitpunkten (10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 ms *post stimulus*) bei 10 V.

Zunächst zeigten die Kurven der optischen Signale ein unterschiedliches Profil in Experimental- und Kontrollgruppe: während die Amplituden im peridysplastischen Kortex innerhalb der ersten 50 ms nach Reizung einen spitzgipfligen Verlauf mit einem Peak bei 10 ms sowohl in den Schichten II/III als auch in Schicht VI aufwiesen, zeigte sich im Kontrollgewebe in beiden Schichten nur ein leicht bogenförmiger Verlauf (Abb. 10). Eine Senkung des optischen Signals zurück auf die Grundlinie, wurde im registrierten Zeitintervall (0 bis 1000 ms) nicht erfasst. In der Experimentalgruppe waren außerdem Unterschiede in der Größe der Amplituden in Laminae II/III und VI erkennbar, die über das gesamte Messintervall (1000 ms) andauerten. In der Kontrollgruppe wichen dagegen die Amplitudengrößen in den supra- und infragranulären Schichten nicht auffallend voneinander ab. Signifikante Unterschiede (Bonferroni-Holm-Verfahren) zwischen peridysplastischem Kortex und Kontrollgewebe ließen sich bis zu 500 ms *post stimulus* an allen untersuchten Zeitpunkten (10, 25, 50, 100, 250 und 500 ms) in Laminae II/III nachweisen. In Schicht VI ergab sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Amplituden der Experimental- und Kontrollgruppe.

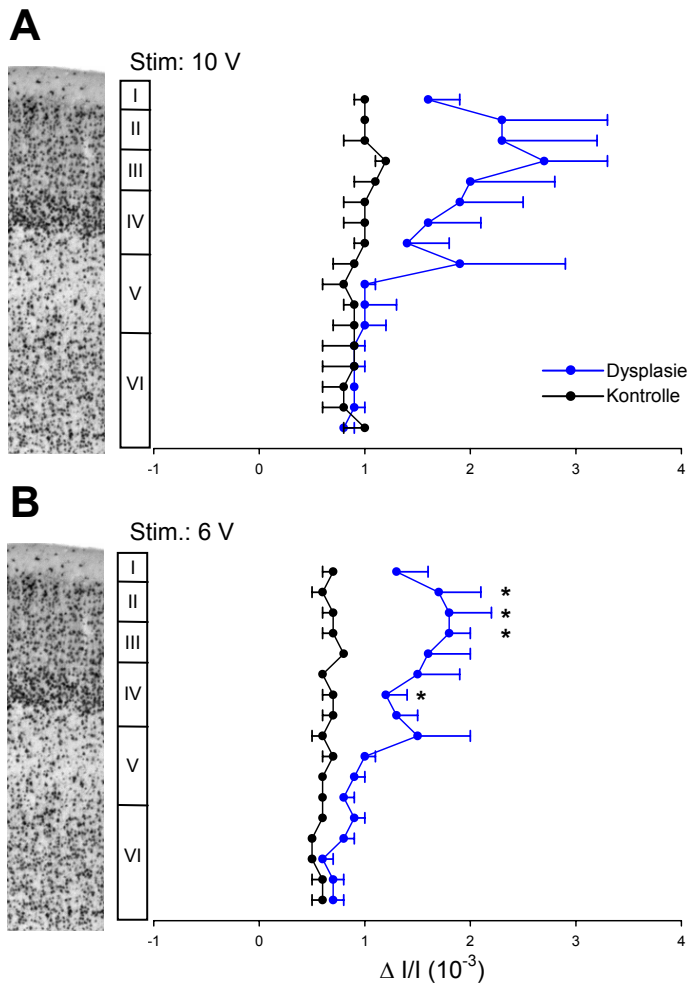


**Abbildung 10.** Lang anhaltende Erregbarkeitssteigerung in den supragranulären Schichten des peridysplastischen Kortex. Der obere Bildteil zeigt zunächst die Hirnschnittpräparate eines Kontroll- (A) und Dysplasietieres (B) in der Messkammer mit eingeblendetem Photodiodenarray (Topographie). Nebenstehend ist die Position des Photodiodenarrays auf den zugehörigen immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitten (NeuN) rekonstruiert (Morphologie). Im unteren Bildteil (Amplitudenverlauf) sind die Amplituden der optischen Signale ( $\Delta I/I$ ) über ein Zeitintervall von 1000 ms dargestellt. Die oberen Kurvendiagramme zeigen dabei eine Ausschnittsvergrößerung der ersten 100 ms. Die Abszisse ist in Abständen von 50 ms unterteilt. Unterhalb der Kurvendiagramme sind die Fluoreszenzveränderungen des optischen Signals als farbkodierte Bilder zu verschiedenen Zeitpunkten der Registrierung abgebildet. Mit roten Linien sind sie dem Kurvenverlauf zeitlich zugeordnet. Räumlich entsprechen sie dem in der Morphologie markierten Areal und verdeutlichen die laminären Unterschiede der Erregung. Es zeigt sich, dass die beobachtete Übererregbarkeit in den Schichten II/III bis zu 500 ms *post stimulus* nachweisbar ist. Signifikante Unterschiede (\*) ergaben sich im Bonferroni-Holm-Verfahren beim Vergleich der jeweils korrespondierenden Kurven in A und B.

### 2.3 Schichtspezifische Analyse der optischen Signale

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Amplitudengrößen in den Schichten II/III und VI im peridysplastischen Gewebe, wurde die Erregbarkeit schichtspezifisch in allen drei Reizintensitäten untersucht. Hierzu wurde die maximale Amplitude an Dioden, die nahezu lotrecht über der Stimulationselektrode lagen, bestimmt. Die Diodenauswahl wurde mit Hilfe der immunhistologischen Färbung getroffen, wodurch unter Zuhilfenahme des anatomischen Atlanten nach Zilles (Zilles K. 1992; Zilles K. und Wree A. 1995) eine schichtspezifische Zuordnung der optischen Signale möglich war.

Tendenziell zeigten sich bei der Experimentalgruppe ( $n = 3$ ) in den Schichten I bis IV größere Amplituden als in den Schichten V und VI. Deutlich weniger ausgeprägt war diese Tendenz auch bei der Kontrollgruppe ( $n = 3$ ) erkennbar. In den unteren Schichten unterschieden sich die Amplituden im peridysplastischen Kortex kaum von denen des Kontrollgewebes. Mit abnehmender Reizstärke wurden die Unterschiede immer deutlicher (Abb. 11). Bei 6 V Reizintensität ergaben sich Differenzen in den Amplituden von bis zu 65% ( $1.8 \pm 0.2 \times 10^{-3} \Delta I/I$  in Schicht III bis  $0.6 \pm 0.1 \times 10^{-3} \Delta I/I$  in Schicht VI). In der Kontrollgruppe variierten die Amplituden lediglich zwischen  $0.8 \pm 0.05 \times 10^{-3} \Delta I/I$  und  $0.6 \pm 0.04 \times 10^{-3} \Delta I/I$  in den Schichten I bis VI. Im direkten, schichtspezifischen Vergleich von peridysplastischem Kortex und Kontrollgewebe ergaben sich bei 6 V signifikante Unterschiede (ungepaarter t-Test) in den Schichten II, III und IV.

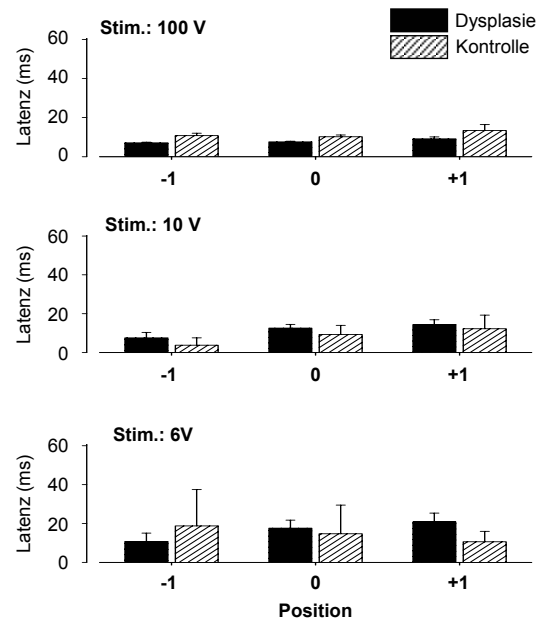


**Abbildung 11.** Laminäres Profil der maximalen Amplituden im parietalen (Kontrolle) und peridysplastischen Kortex (Dysplasie) nach Stimulation mit 10 V (A) und 6 V (B). Der linke Bildrand zeigt eine Ausschnittsvergrößerung eines NeuN-gefärbten Hirnschnittes im Bereich des parietalen Kortex. Die kortikalen Laminae sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet. Die schichtspezifische Darstellung der maximalen Amplituden ( $\Delta I/I$ ) in Kontroll- und Experimentalgruppe schließt sich rechts davon an. Während sich die Amplituden beider Gruppen in den unteren kortikalen Schichten stark annähern, zeigt sich in den Schichten II bis IV des peridysplastischen Kortex jedoch eine deutliche Erregbarkeitssteigerung im Vergleich zum Kontrollgewebe. Bei geringer Reizstärke konnten signifikante Unterschiede (\*) nachgewiesen werden (ungepaarter t-Test).

## 2.4 Bestimmung der Latenz

Neben der Analyse der Amplituden wurde in Experimental- und Kontrollgruppe die Latenz von der Reizung bis zur maximalen Amplitude in den Schichten II/III untersucht. Die optischen Signale wurden dazu erneut fünf Positionen zugeordnet, die in Abhängigkeit von ihrer Entfernung zur Reizelektrode benannt wurden (+2 und +1 medial der Elektrode, 0 über der Elektrode, -1 und -2 lateral der Elektrode). Es wurden alle Reizintensitäten (100, 10 und 6 V) analysiert. In beiden Untersuchungsgruppen war zwischen den einzelnen Positionen keine Tendenz erkennbar. Auch der Vergleich der Latenzen zwischen

Experimental- und Kontrollgruppe (ungepaarter t-Test) zeigte weder in hohen noch in niedrigen Reizstärken signifikante Unterschiede (Abb. 12).



**Abbildung 12.** Unveränderte Latenzen der maximalen Amplitude im peridysplastischen Kortex und parietalen Kontrollgewebe. Die Balkendiagramme bilden die Latenzen der optischen Signale lotrecht über der Reizelektrode (Position 0) und in ihrer Nachbarschaft (-1, +1) ab. Die zeitliche Verzögerung vom Reiz bis zur maximalen Erregung stimmt in Kontroll- und Experimentalgruppe beinahe überein und zeigt sich unabhängig von der Reizintensität.

## 3. Erregbarkeitsänderungen im dysplastischen Kortex

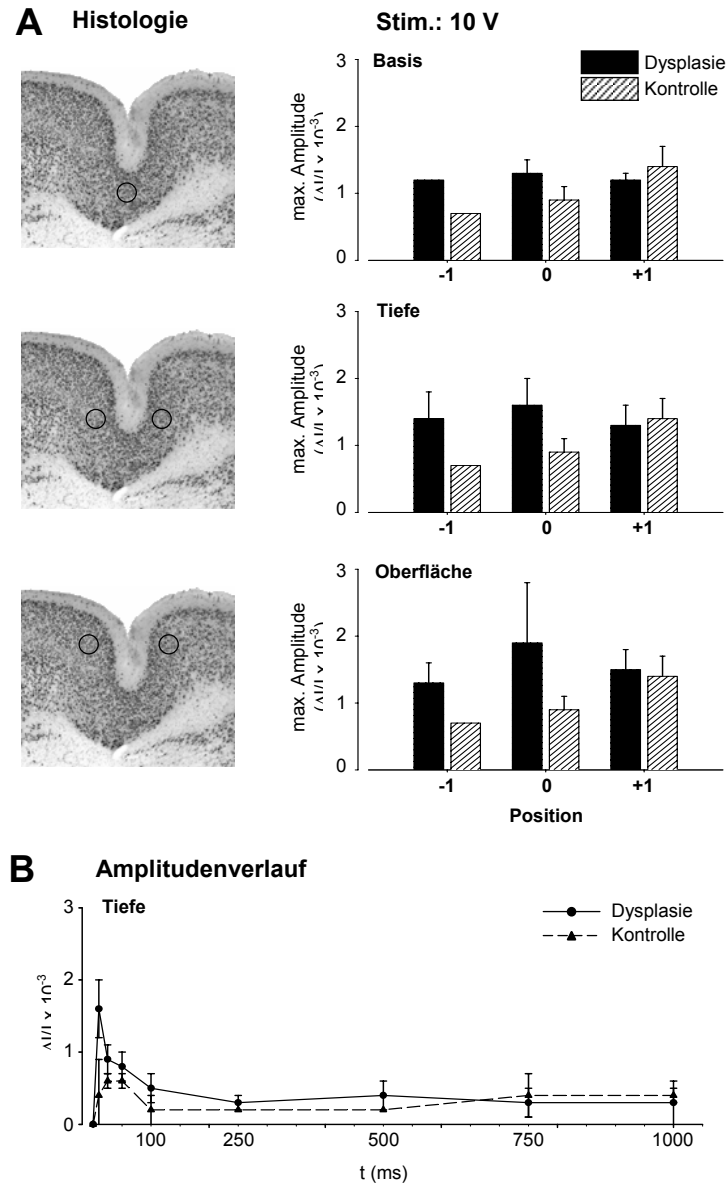
Die Erregbarkeitsänderungen im dysplastischen Kortex wurden an 11 Schnitten von 9 Tieren der Experimentalgruppe im Vergleich zu 3 Schnitten von 3 Kontrolltieren untersucht. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden Hirnschnitte zwischen Bregma -1.8 und -3.3 mm ausgewählt. Die Malformation war in diesem Bereich regelmäßig im Hinterpfotenareal gelegen. Die Untersuchungen erfolgten wiederum bei 100, 10 und 6 V Reizintensität. Zur Auswertung der optischen Signale wurde der Mikrosulcus in einen oberflächlichen, tiefen und basalen Teil gegliedert. In jedem dieser Segmente wurden die Signale vier gemittelter Dioden hinsichtlich der maximalen

Amplitude und des Amplitudenverlaufs (0 bis 1000 ms) analysiert (Abb. 13). Die ausgewählten Signale wurden erneut fünf Positionen zugeordnet, die je nach ihrer Lage und Entfernung zur Reizelektrode benannt wurden. Da sich im Bereich des Mikrosulcus ein Verlust der tiefen kortikalen Schichten zeigte, wurden die optischen Signale des dysplastischen Kortex in den drei Segmenten jeweils mit Laminae II/III des Hinterpfotenareals (HL) von Kontrolltieren verglichen.

Tendenziell zeigten sich im oberflächlichen Teil des dysplastischen Kortex in allen Reizintensitäten größere Amplituden als in den unteren Segmenten. Darüber hinaus war bei 100 und 10 V erneut eine leicht glockenförmige Verteilung der Amplituden auf die Positionen -2 bis +2 mit Höhepunkt an Position 0 erkennbar. In der Kontrollgruppe zeigte sich in allen Reizintensitäten eine kontinuierliche Amplitudenzunahme von der Position -1 bis zur Position +1. Die größeren Amplituden fanden sich vorwiegend in der Experimentalgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Segmenten des dysplastischen Kortex und HL waren jedoch weder in hohen noch in niedrigen Reizstärken nachweisbar.

Der zeitliche Verlauf der Amplituden wurde an Position 0 bei 10 V Reizintensität analysiert. Initial zeigte sich zwar in allen Teilen des Mikrosulcus ein steiler Ausschlag bei etwa 10 ms, der in den Schichten II/III von HL nicht erkennbar war, die Amplituden waren jedoch weder initial noch im weiteren Verlauf signifikant verschieden.





**Abbildung 13.** Neuronale Aktivität im dysplastischen Kortex. **A:** Die linke Bildhälfte zeigt die kortikale Malformation NeuN-gefärbter Hirnschnitte mit Kennzeichnung der Messpositionen in drei unterschiedlichen Bereichen der Dysplasie (Basis, Tiefe und Oberfläche). Die maximalen Amplituden der optischen Signale sind nach Stimulation mit 10 V entsprechend ihrer kortikalen Lokalisation in den zugehörigen Balkendiagrammen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Erregbarkeit in Experimental- und Kontrollgruppe konnten in keiner Ebene nachgewiesen werden. **B:** Im zeitlichen Verlauf über 1000 ms *post stimulus* zeigt die kortikale Aktivität im dysplastischen Kortex ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zum Kontrollgewebe. Exemplarisch ist die Erregung in der Tiefe des Mikrosulcus an Position 0 nach Stimulation mit 10 V abgebildet.

## **VI. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Induktion einer fokalen kortikalen Malformation eine deutliche Übererregbarkeit im peridysplastischen Kortex beobachtet. Nach Stimulation mit geringen Reizintensitäten wurde mit Hilfe der optischen Ableitungen eine erheblich verstärkte neuronale Aktivität erfasst, die im Vergleich zu den Kontrolltieren über mehrere 100 ms anhielt. Diese Übererregbarkeit war in der über der Reizposition gelegenen kortikalen Kolumne am stärksten ausgeprägt und nahm typischerweise in den benachbarten Kolumnen glockenförmig ab. Im entsprechenden Kontrollgewebe konnten diese Charakteristika nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich, dass die Übererregbarkeit fast ausschließlich in den supragranulären Schichten II/III auftrat, während infragranulär die Amplituden in Experimental- und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden waren. Die Malformation selbst wies in ihrer Erregbarkeit kaum Unterschiede zum Kontrollgewebe auf.

### **Übererregbarkeit im peridysplastischen Kortex**

Der Nachweis einer Übererregbarkeit im peridysplastischen Kortex zeigte eine enge Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorangegangener Studien, die ebenfalls eine Hyperexzitabilität mit lang anhaltenden multiphasischen Feldpotentialen im peridysplastischen Kortex nachweisen konnten (Defazio und Hablitz 2000; Hablitz und DeFazio 1998; Jacobs et al. 1996; Jacobs et al. 1999; Luhmann et al. 1998a; Luhmann et al. 1998b; Redecker et al. 1998). Die lang anhaltende multiphasische Aktivität trat dabei lediglich in geringeren Reizintensitäten auf und zeigte eine hohe Variabilität in den Reizantworten (Hoffman et al. 1994; Jacobs et al. 1996; Prince und Tseng 1993). Mehrere elektrophysiologische Untersuchungen erbrachten den Nachweis, dass diese multiphasische Aktivität mit der epileptiformen Aktivität, wie sie in Modellen chronischer Epilepsie gefunden wird, übereinstimmte (Brener et al. 1991; Hoffman et al. 1994; Prince und Tseng 1993). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptorantagonisten die multiphasische Aktivität reversibel blockieren können (Jacobs et al. 1999; Luhmann et al. 1998a), während eine Aktivierung von AMPA-Rezeptoren als Ursache für die

Propagation der Übererregbarkeit auf entfernte Kortexregionen angenommen wird (Luhmann et al. 1998b; Luhmann und Raabe 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde in den synchronen Feldpotentialableitungen keine lang anhaltende multiphasische Aktivität registriert. Die optischen Signale zeigten allerdings eine späte, mehrere 100 ms anhaltende Erregbarkeitssteigerung, die über das registrierte Zeitintervall hinaus anhielt. Eine Erklärung könnte in dem abweichenden Reizparadigma liegen, das hier gewählt wurde. Beginnend mit einer Reizstärke von 100 V wurde die Stimulation über 10 auf 6 V reduziert. Durch die initial hohe Reizintensität wurden möglicherweise inhibitorische Prozesse aktiviert, die zu einer dauerhaften Unterdrückung der multiphasischen Aktivität führten (Chagnac-Amitai und Connors 1989; Prince und Tseng 1993). Darüber hinaus ist der Einfluss des „bleaching“-Effekts, d.h. der Ausbleichprozess der spannungssensitiven Farbstoffe, zu diskutieren. Bei häufig wiederholter Belichtung nimmt die Grundfluoreszenz oder die spannungsabhängige Fluoreszenzausbeute der Farbstoffe ab, was zwangsläufig zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses führt und damit die Qualität der optischen Signale reduziert (Albowitz und Kuhnt 1993; Jin et al. 2002). Zwar wurde versucht mit streng limitierten Belichtungszeiten, den „bleaching“-Effekt zu minimieren, er konnte jedoch nicht gänzlich verhindert werden.

Als grundlegender pathogenetischer Faktor für die Hyperexzitabilität bzw. die lang anhaltende multiphasische Aktivität wurde ein Ungleichgewicht von Exzitation und Inhibition nachgewiesen. Veränderungen an glutamatergen und GABAergen Rezeptoren im dysplastischen Kortex und in benachbarten Regionen wurden dazu mit Hilfe von autoradiographischen und immunhistochemischen Methoden untersucht, wobei Änderungen in der Rezeptorbindung sowohl als veränderte Rezeptordichte als auch als modifizierte Affinität zum Rezeptor interpretiert werden konnten. Zilles und Kollegen (1998) analysierten autoradiographisch zunächst NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren und ermittelten im dysplastischen Kortex eine erhöhte Bindung an diese Rezeptoren. Darüber hinaus wurde in der Umgebung der Dysplasie und in entfernten Regionen eine Heraufregulation der Bindung an AMPA- und Kainat-Rezeptoren festgestellt. Weitere Untersuchungen mit den selektiven GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Agonisten Muscimol und Baclofen ergaben eine

deutlich verminderte Bindung an beiden Rezeptoren im dysplastischen Kortex, wobei im peridysplastischen Gewebe vor allem eine Reduktion der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorbindung nachgewiesen wurde. Redecker und Mitarbeiter (2000b) zeigten immunhistochemisch ebenfalls eine regional differenzielle Reduktion der Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten. Diese Modulation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorzusammensetzung trägt vermutlich wesentlich zu der verminderten Bindung bei. Veränderungen der Rezeptorexpression konnten mittels mRNA-Amplifizierung auch an menschlichem, fokal dysplastischem Kortexgewebe nachgewiesen werden (Crino et al. 2001).

### **Laminäre Verteilung der Erregbarkeitsänderungen**

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass die Hyperexzitabilität auf die Laminae II/III beschränkt war. Sie stehen im Einklang zu Studien, die chronisch epileptogenes Kortexgewebe des Menschen analysierten und eine Initiierung epileptiformer Aktivität in den oberen kortikalen Schichten fanden (Kohling et al. 2000). Feldpotentialableitungen in anderen Studien, die sich ebenfalls mit der Übererregbarkeit in der Umgebung kortikaler Malformationen beschäftigten, konnten die Neigung zur Übererregbarkeit speziell in den supragranulären Schichten bisher nicht nachweisen, da Feldpotentiale in ihrer räumlichen Auflösung eingeschränkt sind (Hablitz und DeFazio 1998; Jacobs et al. 1996; Luhmann et al. 1998b; Redecker et al. 1998). Jacobs und Kollegen (1999) wiesen jedoch im peridysplastischen Gewebe mit einem lotrecht zur pialen Oberfläche positionierten Elektroden-Array multiphasische Aktivität in allen kortikalen Schichten nach, wobei jedoch die größten Amplituden in den Laminae II/III registriert wurden. Des Weiteren zeigten neuroanatomische Untersuchungen, dass die Dendriten von Neuronen der Laminae II/III im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant kürzer waren und die Anzahl ihrer Dornen („spines“) erheblich reduziert war (Di Rocco et al. 2001). Die physiologische Funktion der „spines“ ist zwar noch nicht vollständig geklärt, mehrere Studien weisen jedoch darauf hin, dass mit zunehmender neuronaler Aktivierung die Dichte der dendritischen Dornen abnimmt (Harris 1999; Isokawa 1998; Jiang et al. 1998). Ähnliche Befunde wurden an menschlichem Gewebe von Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie erhoben (Multani et al. 1994). Intrazelluläre Messungen zeigten in der Nähe zum Mikrosulcus eine Verminderung

evozierter, polysynaptischer, GABA<sub>A</sub>-vermittelter IPSPs in Neuronen der Schichten II/III (Luhmann et al. 1998a). Nach pharmakologischer Isolation der GABA<sub>A</sub>-vermittelten Aktivität, waren in dieser Studie die monosynaptischen IPSPs im dysplastischen Kortex und Kontrollgewebe allerdings nicht signifikant verschieden. Weiter lateral im peridysplastischen Kortex, zeigten Neurone der Schicht V evozierte und spontane IPSPs mit deutlich größeren Amplituden als im Kontrollkortex (Prince et al. 1997). Die Veränderungen der inhibitorischen Funktion wurden in beiden Studien als Änderung der exzitatorischen Innervation von GABAergen Neuronen interpretiert. Eine verminderte Hemmung in den oberen kortikalen Schichten könnte demnach eine mögliche Ursache für die dortige Übererregbarkeit sein.

Neben einem Ungleichgewicht exzitatorischer und inhibitorischer Einflüsse in den supragranulären Schichten, ist eine Störung der Konnektivität in der Umgebung von kortikalen Malformationen zu diskutieren. Giannetti und Kollegen untersuchten die kallosalen Verbindungen in der Nachbarschaft zur Dysplasie und fanden eine anormale Verteilung kallosal projizierender Fasern. Ihre Ergebnisse zeigten jedoch den größten Anteil kallosaler Neurone in Schicht VI des peridysplastischen Gewebes, während im Kontrollgewebe vor allem Neurone der Schichten II/III und V an transkallosalen Verbindungen beteiligt waren (Giannetti et al. 1999). Es ist jedoch denkbar, dass mit der gewählten neuroanatomischen Methode, transkallosale Verbindungen retrograd anzufärben, nicht das gesamte Ausmaß der Faserprojektionen erfasst wurde. Rosen und Mitarbeiter (2000) untersuchten im Kälteläsionsmodell ebenfalls afferente und efferente Verbindungen zwischen beiden Hemisphären und zwischen Thalamus und Kortex. Sie zeigten im dysplastischen Kortex einerseits eine Verminderung homotoper Verschaltungen und andererseits eine Zunahme heterotoper Projektionen sowohl für kallosal-kortikale als auch für thalamo-kortikale Verbindungen. Eine deutliche Verdichtung thalamo-kortikaler Verknüpfungen fanden die Autoren an der Grenze von Mikrosulcus und intaktem Gewebe. Thalamische Afferenzen sprossen im Rahmen der kortikalen Entwicklung zunächst unspezifisch in ausgedehnte Kortexareale ein. Da sie erst im weiteren Verlauf, lokalen molekularen Signalen folgend, charakteristische Verbindungen eingehen (Castellani und Bolz 1997), ist es denkbar, dass thalamo-kortikale Fasern im Bereich der Texturstörung ihre Zielzellen verlieren.

Dadurch entstehen im peridysplastischen Kortex möglicherweise aberrante Verbindungen, die eine veränderte Erregungsverarbeitung in diesem Gebiet zur Folge haben.

### **Funktionelle Auswirkungen**

Das Auftreten einer Übererregbarkeit speziell in den Schichten II/III des peridysplastischen Kortex steht also wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit einer irregulären kortikalen Konnektivität in der Umgebung fokaler kortikaler Malformationen. Elektrophysiologische Untersuchungen zur Konnektivität im peridysplastischen Kortex analysierten das Auftreten von Lang-Zeit-Potenzierung in den Schichten II/III. Der Lang-Zeit-Potenzierung (LTP) liegt ein anhaltender Anstieg synaptischer Aktivität als Folge repetitiver hochfrequenter Stimulation zugrunde. Peters und Kollegen (2000) zeigten im Kälteläsionsmodell, dass LTP in den Laminae II/III bei Tieren mit fokaler kortikaler Malformation nur nach Stimulation in Schicht VI induziert werden konnte, während sie bei Kontrolltieren nur nach Stimulation in Schicht IV auftrat. Eine fehlerhafte Auslösbarkeit der LTP im peridysplastischen Kortex im Vergleich zum Kontrollgewebe stellt eine funktionelle Evidenz für eine aberrante kortikale Verschaltung in der Nachbarschaft zur Dysplasie dar. Die Signalverarbeitung ist somit in der Umgebung der Läsionen gestört und könnte auch für die im Zusammenhang mit kortikalen Malformationen auftretenden neuropsychologischen Defizite verantwortlich sein. Mehrere verhaltenswissenschaftliche Studien konnten eine Verbindung zwischen fokalen kortikalen Malformationen und der kognitiven Leistung, sowie der auditorischen Erregungsverarbeitung im Tierexperiment nachweisen (Clark et al. 2000a; Clark et al. 2000b; Herman et al. 1997; Rosen et al. 1995). Fitch und Kollegen (1994) untersuchten männliche Ratten mit fokaler kortikaler Dysplasie im Hinblick auf die Fähigkeit, zwei auditorische Reize unterschiedlicher Frequenz, in immer kürzer werdenden Abständen zu diskriminieren. Die Fähigkeit, zwei Stimuli zu unterscheiden, konnte durch eine ausreichend lange Reizpause bei allen Tieren nachgewiesen werden. Mit abnehmendem Stimulationsintervall trat jedoch bei Versuchstieren mit fokalen Läsionen eine signifikante Beeinträchtigung in der Diskrimination der Stimuli auf. Die Autoren zeigten damit, dass fokale kortikale Malformationen die schnelle auditorische Reizverarbeitung beeinträchtigen

können und erbrachten außerdem einen weiteren funktionellen Nachweis für eine aberrante Verschaltung im geschädigten Kortex.

Eine erhöhte Erregbarkeit im dysplastischen Kortex einerseits und eine aberrante Konnektivität andererseits werden ebenfalls als Ursache schwerer Anfallsleiden gesehen. Elektrophysiologische Untersuchungen fanden in verschiedenen Läsionsmodellen eine lang anhaltende, multiphasische Aktivität, die in hoher Übereinstimmung mit der interiktalen, epileptiformen Aktivität stand, wie sie in Modellen chronisch fokaler Epilepsie zu finden ist (Hoffman et al. 1994; Prince und Tseng 1993). Das Auftreten synchronisierter, paroxysmaler Aktivität ist zum einen entscheidend abhängig von der potentiellen Erregbarkeit der unterschiedlichen Neurone des Neokortex und deren Schaltkreisen (Connors und Gutnick 1990). Pyramidenzellen der Lamina V zeigten in einigen Studien eine hohe Erregungsbereitschaft mit intrinsisch rhythmischen Entladungen und wurden als Ursprung epileptiformer Aktivität angesehen (Connors 1984; Silva et al. 1991). Andere Untersuchungen ergaben jedoch eine erhöhte Exzitabilität in Pyramidenzellen der Schicht II, die mit dem Auftreten abnormaler Entladungen in dieser Region in Einklang stand (De Curtis et al. 1994). Weitere Studien, die nach horizontaler Trennung der kortikalen Laminae die neuronale Erregungsbereitschaft und Aktivität analysierten, wiesen nach, dass epileptiforme Aktivität von Neuronen in Schicht II/III und in Schicht V generiert werden kann (Albowitz und Kuhnt 1995; Flint und Connors 1996). Epileptiforme Aktivität konnte im peridysplastischen Kortex sogar nach vertikaler Abtrennung des Mikrosulcus vom Hirnschnittpräparat mit einer Regenerierungszeit von etwa 23 min nachgewiesen werden (Jacobs et al. 1999). Die Reizintensitäten, die zur Evozierung epileptiformer Aktivität benötigt wurden, zeigten dabei vor und nach der kortikalen Transsektion keine Unterschiede. Jüngste in-vitro Untersuchungen konnten dagegen nach maximaler Reduktion von  $Mg^{2+}$  in der Perfusionslösung die Initiation epileptiformer Aktivität im Mikrosulcus selbst nachweisen (Redecker C. et al. 2003; Redecker et al. 2001). Die hier beobachtete epileptiforme Aktivität ist qualitativ jedoch unterschiedlich zu der epileptiformen Übererregbarkeit in den vorher beschriebenen Studien und legt nahe, dass verschiedene Formen epileptiformer Aktivität in unterschiedlichen kortikalen Arealen auftreten können. Darüber hinaus mögen diese unterschiedlichen Ergebnisse auf eine

abweichende Methodik oder wechselnde zytoarchitektonische Areale zurückzuführen sein. Weiterhin zeigen sie aber auch, dass die Entstehung epileptiformer Aktivität vermutlich durch mehrere, in Wechselwirkung stehende Faktoren beeinflusst ist. Eine aberrante Konnektivität ist dabei ein weiteres pathogenetisches Merkmal. Studien, die nicht die Erregbarkeit einzelner Neuronenpopulationen schichtspezifisch analysierten, sondern den Einfluss des Mikrosulcus untersuchten, zeigten epileptiforme Aktivität im peridysplastischen Gewebe mit einer Ausdehnung von über 4 mm in horizontaler Richtung lateral des Mikrosulcus (Luhmann et al. 1998b; Luhmann und Raabe 1996). Jacobs und Kollegen (1999) fanden epileptiforme Aktivität in der Nachbarschaft zum Mikrosulcus innerhalb einer Generierungszone von 0.5 – 2.5 mm. Diese Befunde verdeutlichen das weitreichende Ausmaß der Texturstörung und die Beeinträchtigung des scheinbar intakten peridysplastischen Gewebes. Sie stützen dabei die These, dass aussprossende Afferenzen nach dem frühen, läSIONSbedingten Untergang von Neuronenpopulationen eine aberrante Konnektivität mit einer Fülle von exzitatorischen Inputs in der Umgebung der kortikalen Läsion zeigen. Die fehlerhafte Organisation des kortikalen Netzwerkes mit einem Ungleichgewicht exzitatorischer und inhibitorischer Verbindungen stellt einen entscheidenden Faktor für die Generierung epileptiformer Aktivität dar.



## **VII. Schlussfolgerungen**

Die vorliegende Studie liefert den Nachweis einer Hyperexzitabilität in den oberen kortikalen Schichten des peridysplastischen Kortex. Sie bestätigt damit frühere Arbeiten, in denen nachgewiesen wurde, dass die funktionellen Veränderungen weit über die strukturelle kortikale Texturstörung hinausgehen. Mit der vorliegenden Studie wurde allerdings nachgewiesen, dass diese Erregbarkeitsänderungen im peridysplastischen Kortex auf die oberen Kortexschichten begrenzt sind. Das umgrenzte Auftreten der Übererregbarkeit weist auf eine aberrante kortikale Konnektivität in der Umgebung der Dysplasie hin. Zusammen mit dem in anderen Studien beschriebenen Ungleichgewicht von Exzitation und Inhibition ist diese fehlerhafte kortikale Verschaltung vermutlich maßgeblich an dem Auftreten schwerer Anfallsleiden beteiligt. Die Lokalisation des epileptogenen Fokus wurde in vorangegangenen Untersuchungen zwar unterschiedlich beschrieben, eine Beteiligung der hier beschriebenen Übererregbarkeit bezüglich Entstehung und Propagation epileptiformer Aktivität ist jedoch wahrscheinlich. Die fehlerhafte Verschaltung und Signalverarbeitung ist möglicherweise an der Pathogenese neuropsychologischer Defizite beteiligt, welche bei einer großen Gruppe von Patienten mit fokalen kortikalen Malformationen beobachtet werden. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde zeigen an, dass die funktionellen Veränderungen weit über die kortikale Dysplasie hinaus gehen und auch den morphologisch intakten Kortex betreffen. Dieser Befund ist vermutlich eine wesentliche Ursache für die zum Teil unbefriedigenden Ergebnisse epilepsiechirurgischer Behandlungen, bei denen lediglich die Läsion entfernt wurde. Die Ergebnisse unterstreichen aber auch die Wichtigkeit einer exakten präoperativen Diagnostik mit einer exakten Lokalisation des epileptogenen Fokus bei Patienten mit kortikalen Malformationen. Für eine präzise Lokalisation des epileptogenen Fokus ist allerdings auch ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Auswirkungen fokaler kortikaler Dysplasien erforderlich.

Anknüpfend an diese Ergebnisse sollten weiter entfernte Kortexregionen, wie die kontralaterale Hemisphäre funktionell untersucht werden. Andere Studien konnten bereits kontralateral zur Dysplasie ein verändertes Verhältnis von

Exzitation und Inhibition nachweisen, so dass ebenfalls ein verändertes Muster der Erregbarkeit angenommen werden kann. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, warum in diesem Modell zwar ausgedehnte Erregbarkeitssteigerungen aber keine spontanen paroxysmalen epileptischen Entladungen auftreten. Es ist hoch wahrscheinlich, dass mit Hilfe spannungssensitiver Farbstoffe bei einem veränderten Reizparadigma, z. B. bei Reizung mit Serien von Impulsen, oder einem modifiziertem Versuchsablauf, z. B. bei Anhebung der allgemeinen Erregbarkeit, eine epileptiforme Aktivität nachweisbar ist. In diesem Zusammenhang kann es auch aufschlussreich sein, den Einfluss des Alters auf Erregbarkeitsänderungen oder das Auftreten epileptiformer Aktivität zu analysieren.

**VIII. Literatur**

Albowitz, B. und Kuhnt, U. Evoked changes of membrane potential in guinea pig sensory neocortical slices: an analysis with voltage-sensitive dyes and a fast optical recording method. *Exp.Brain Res.* 93: 213-225, 1993.

Albowitz, B. und Kuhnt, U. Epileptiform activity in the guinea-pig neocortical slice spreads preferentially along supragranular layers--recordings with voltage-sensitive dyes. *Eur.J.Neurosci.* 7: 1273-1284, 1995.

Altman, J. und Bayer, S. A. Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp.Neurol.* 107: 23-35, 1990.

Barkovich, A. J. Malformations of neocortical development: magnetic resonance imaging correlates. *Curr.Opin.Neurol.* 9: 118-121, 1996.

Barkovich, A. J., Gressens, P. und Evrard, P. Formation, maturation, and disorders of brain neocortex. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 13: 423-446, 1992.

Barkovich, A. J., Kuzniecky, R. I., Dobyns, W. B., Jackson, G. D., Becker, L. E. und Evrard, P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 27: 59-63, 1996.

Brener, K., Amitai, Y., Jefferys, J. G. und Gutnick, M. J. Chronic Epileptic Foci in Neocortex: In Vivo and In Vitro Effects of Tetanus Toxin. *Eur.J.Neurosci.* 3: 47-54, 1991.

Castellani, V. und Bolz, J. Membrane-associated molecules regulate the formation of layer-specific cortical circuits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 7030-7035, 1997.

Chagnac-Amitai, Y. und Connors, B. W. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J.Neurophysiol.* 61: 747-758, 1989.

Chugani, H. T., Shewmon, D. A., Peacock, W. J., Shields, W. D., Mazziotta, J. C. und Phelps, M. E. Surgical treatment of intractable neonatal-onset seizures: the role of positron emission tomography. *Neurology* 38: 1178-1188, 1988.

Chugani, H. T., Shields, W. D., Shewmon, D. A., Olson, D. M., Phelps, M. E. und Peacock, W. J. Infantile spasms: I. PET identifies focal cortical dysgenesis in cryptogenic cases for surgical treatment. *Ann.Neurol.* 27: 406-413, 1990.

Clark, M. G., Rosen, G. D., Tallal, P. und Fitch, R. H. Impaired processing of complex auditory stimuli in rats with induced cerebrocortical microgyria: An animal model of developmental language disabilities. *J.Cogn Neurosci.* 12: 828-839, 2000a.

Clark, M. G., Rosen, G. D., Tallal, P. und Fitch, R. H. Impaired two-tone processing at rapid rates in male rats with induced microgyria. *Brain Res.* 871: 94-97, 2000b.

Connors, B. W. Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature* 310: 685-687, 1984.

Connors, B. W. und Gutnick, M. J. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13: 99-104, 1990.

Crino, P. B., Duhaime, A. C., Baltuch, G. und White, R. Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology* 56: 906-913, 2001.

De Curtis, M., Biella, G., Forti, M. und Panzica, F. Multifocal spontaneous epileptic activity induced by restricted bicuculline ejection in the piriform cortex of the isolated guinea pig brain. *J.Neuropsychiol.* 71: 2463-2476, 1994.

Defazio, R. A. und Hablitz, J. J. Alterations in NMDA receptors in a rat model of cortical dysplasia. *J.Neuropsychiol.* 83: 315-321, 2000.

Di Rocco, F., Giannetti, S., Gaglini, P., Di Rocco, C. und Granato, A. Dendritic anomalies in a freezing model of microgyria: a parametric study. *Pediatr.Neurosurg.* 34: 57-62, 2001.

Dobyns WB und Kuzniecky R Normal development and malformations of the cortex. *The treatment of epilepsy: principles and practice* (Wyllie E, ed), Baltimore, Williams & Wilkins 93-105, 1996.

Dvorak, K. und Feit, J. Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria. Histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol.(Berl)* 38: 203-212, 1977.

Fitch, R. H., Tallal, P., Brown, C. P., Galaburda, A. M. und Rosen, G. D. Induced microgyria and auditory temporal processing in rats: a model for language impairment? *Cereb.Cortex* 4: 260-270, 1994.

Flint, A. C. und Connors, B. W. Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *J.Neurophysiol.* 75: 951-957, 1996.

Galaburda, A. M., Sherman, G. F., Rosen, G. D., Aboitiz, F. und Geschwind, N. Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies. *Ann.Neurol.* 18: 222-233, 1985.

Giannetti, S., Gaglini, P., Granato, A. und Di Rocco, C. Organization of callosal connections in rats with experimentally induced microgyria. *Childs Nerv.Syst.* 15: 444-448, 1999.

Gressens, P. Mechanisms of cerebral dysgenesis. *Curr.Opin.Pediatr.* 10: 556-560, 1998.

Guerrini, R., Andermann, E., Avoli, M. und Dobyns, W. B. Cortical dysplasias, genetics, and epileptogenesis. *Adv.Neurol.* 79:95-121.: 95-121, 1999.

Haas, H. L., Schaerer, B. und Vosmansky, M. A simple perfusion chamber for the study of nervous tissue slices in vitro. *J.Neurosci.Methods* 1: 323-325, 1979.

Hablitz, J. J. und Defazio, R. A. Altered receptor subunit expression in rat neocortical malformations. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S82-S85, 2000.

Hablitz, J. J. und DeFazio, T. Excitability changes in freeze-induced neocortical microgyria. *Epilepsy Res.* 32: 75-82, 1998.

- Hagemann, G., Redecker, C. und Witte, O. W. [Cortical dysgenesis: current classification, MRI diagnosis, and clinical review]. *Nervenarzt* 71: 616-628, 2000.
- Harris, K. M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr.Opin.Neurobiol.* 9: 343-348, 1999.
- Herman, A. E., Galaburda, A. M., Fitch, R. H., Carter, A. R. und Rosen, G. D. Cerebral microgyria, thalamic cell size and auditory temporal processing in male and female rats. *Cereb.Cortex* 7: 453-464, 1997.
- Hoffman, S. N., Salin, P. A. und Prince, D. A. Chronic neocortical epileptogenesis in vitro. *J.Neurophysiol.* 71: 1762-1773, 1994.
- Humphreys, P., Kaufmann, W. E. und Galaburda, A. M. Developmental dyslexia in women: neuropathological findings in three patients. *Ann.Neurol.* 28: 727-738, 1990.
- Humphreys, P., Rosen, G. D., Press, D. M., Sherman, G. F. und Galaburda, A. M. Freezing lesions of the developing rat brain: a model for cerebrocortical microgyria. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 50: 145-160, 1991.
- Isokawa, M. Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci.Lett.* 258: 73-76, 1998.
- Jacobs, K. M., Gutnick, M. J. und Prince, D. A. Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cereb.Cortex* 6: 514-523, 1996.
- Jacobs, K. M., Hwang, B. J. und Prince, D. A. Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *J.Neurophysiol.* 81: 159-173, 1999.
- Jiang, M., Lee, C. L., Smith, K. L. und Swann, J. W. Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset epilepsy. *J.Neurosci.* 18: 8356-8368, 1998.
- Jin, W., Zhang, R. J. und Wu, J. Y. Voltage-sensitive dye imaging of population neuronal activity in cortical tissue. *J.Neurosci.Methods* 115: 13-27, 2002.

Kohling, R., Hohling, J. M., Straub, H., Kuhlmann, D., Kuhnt, U., Tuxhorn, I., Ebner, A., Wolf, P., Pannek, H. W., Gorji, A. und Speckmann, E. J. Optical monitoring of neuronal activity during spontaneous sharp waves in chronically epileptic human neocortical tissue. *J.Neurophysiol.* 84: 2161-2165, 2000.

Kuzniecky, R., Murro, A., King, D., Morawetz, R., Smith, J., Powers, R., Yaghmai, F., Faught, E., Gallagher, B. und Snead, O. C. Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology* 43: 681-687, 1993.

Lee, N., Radtke, R. A., Gray, L., Burger, P. C., Montine, T. J., DeLong, G. R., Lewis, D. V., Oakes, W. J., Friedman, A. H. und Hoffman, J. M. Neuronal migration disorders: positron emission tomography correlations. *Ann.Neurol.* 35: 290-297, 1994.

Lehericy, S., Dormont, D., Semah, F., Clemenceau, S., Granat, O., Marsault, C. und Baulac, M. Developmental abnormalities of the medial temporal lobe in patients with temporal lobe epilepsy. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 16: 617-626, 1995.

Luhmann, H. J., Karpuk, N., Qu, M. und Zilles, K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. *J.Neurophysiol.* 80: 92-102, 1998a.

Luhmann, H. J. und Raabe, K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. *Epilepsy Res.* 26: 67-74, 1996.

Luhmann, H. J., Raabe, K., Qu, M. und Zilles, K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. *Eur.J.Neurosci.* 10: 3085-3094, 1998b.

Mattia, D., Olivier, A. und Avoli, M. Seizure-like discharges recorded in human dysplastic neocortex maintained in vitro. *Neurology* 45: 1391-1395, 1995.

Michaelis, R. und Niemann, G. Entwicklungsneurologie und Neuropädiatrie; Grundlagen und diagnostische Strategien. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart.* 1999.

Multani, P., Myers, R. H., Blume, H. W., Schomer, D. L. und Sotrel, A. Neocortical dendritic pathology in human partial epilepsy: a quantitative Golgi study. *Epilepsia* 35: 728-736, 1994.

Olson, D. M., Chugani, H. T., Shewmon, D. A., Phelps, M. E. und Peacock, W. J. Electrocorticographic confirmation of focal positron emission tomographic abnormalities in children with intractable epilepsy. *Epilepsia* 31: 731-739, 1990.

Palmini, A., Andermann, F., Olivier, A., Tampieri, D. und Robitaille, Y. Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: results of surgical treatment. *Ann.Neurol.* 30: 750-757, 1991a.

Palmini, A., Andermann, F., Olivier, A., Tampieri, D., Robitaille, Y., Andermann, E. und Wright, G. Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: a study of 30 patients. *Ann.Neurol.* 30: 741-749, 1991b.

Palmini, A., Gambardella, A., Andermann, F., Dubeau, F., da Costa, J. C., Olivier, A., Tampieri, D., Gloor, P., Quesney, F., Andermann, E. und . Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann.Neurol.* 37: 476-487, 1995.

Palmini, A., Gambardella, A., Andermann, F., Dubeau, F., da Costa, J. C., Olivier, A., Tampieri, D., Robitaille, Y., Paglioli, E., Paglioli, N. E. und . Operative strategies for patients with cortical dysplastic lesions and intractable epilepsy. *Epilepsia* 35 Suppl 6:S57-71.: S57-S71, 1994.

Peters, O. H., Hagemann, G., Bruehl, C., Redecker, C., Luhmann, H. J. und Witte, O. W. Neocortical long-term potentiation in a rat model of polymicrogyria. *Eur.J.Neurosci.* 12(Suppl.), 251 2000.

Prince, D. A., Jacobs, K. M., Salin, P. A., Hoffman, S. und Parada, I. Chronic focal neocortical epileptogenesis: does disinhibition play a role? *Can.J.Physiol Pharmacol.* 75: 500-507, 1997.

Prince, D. A. und Tseng, G. F. Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. *J.Neurophysiol.* 69: 1276-1291, 1993.



Quill, S., Redecker, C., Hagemann, G., Köhling, R., Straub, H., Witte, O. W. und Speckmann, E. J. Excitability changes in the surround of experimentally induced focal cortical malformations: an optical imaging study. *Soc.Neurosci.Abstr.* 2002.

Raymond, A. A., Fish, D. R., Sisodiya, S. M., Alsanjari, N., Stevens, J. M. und Shorvon, S. D. Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dysembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients. *Brain* 118: 629-660, 1995.

Redecker C. et al. Optical imaging of initiation of epileptiform activity in experimentally induced cortical malformations. *eingereicht* 2003.

Redecker, C., Hagemann, G., Gressens, P., Evrard, P. und Witte, O. W. [Cortical dysgenesis. Current views on pathogenesis and pathophysiology]. *Nervenarzt* 71: 238-248, 2000a.

Redecker, C., Hagemann, G., Hohling, J. M., Straub, H., Witte, O. W. und Speckmann, E. J. Initiation and propagation of epileptiform activity in experimentally induced cortical malformations: an optical imaging study. *Soc.Neurosci.Abstr.* 2001.

Redecker, C., Luhmann, H. J., Hagemann, G., Fritschy, J. M. und Witte, O. W. Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J.Neurosci.* 20: 5045-5053, 2000b.

Redecker, C., Lutzenburg, M., Gressens, P., Evrard, P., Witte, O. W. und Hagemann, G. Excitability changes and glucose metabolism in experimentally induced focal cortical dysplasias. *Cereb.Cortex* 8: 623-634, 1998.

Rosen, G. D., Burstein, D. und Galaburda, A. M. Changes in efferent and afferent connectivity in rats with induced cerebrocortical microgyria. *J.Comp Neurol.* 418: 423-440, 2000.

- Rosen, G. D., Press, D. M., Sherman, G. F. und Galaburda, A. M. The development of induced cerebrocortical microgyria in the rat. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 51: 601-611, 1992.
- Rosen, G. D., Sherman, G. F. und Galaburda, A. M. Birthdates of neurons in induced microgyria. *Brain Res.* 727: 71-78, 1996.
- Rosen, G. D., Waters, N. S., Galaburda, A. M. und Denenberg, V. H. Behavioral consequences of neonatal injury of the neocortex. *Brain Res.* 681: 177-189, 1995.
- Ross, W. N., Salzberg, B. M., Cohen, L. B. und Davila, H. V. A large change in dye absorption during the action potential. *Biophys.J.* 14: 983-986, 1974.
- Salzberg, B. M., Davila, H. V. und Cohen, L. B. Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature* 246: 508-509, 1973.
- Salzberg, B. M., Obaid, A. L. und Bezanilla, F. Microsecond response of a voltage-sensitive merocyanine dye: fast voltage-clamp measurements on squid giant axon. *Jpn.J.Physiol* 43 Suppl 1: S37-S41, 1993.
- Schachter, S. C., Galaburda, A. M. und Ransil, B. J. Associations of dyslexia with epilepsy, handedness, and gender. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 682: 402-403, 1993.
- Silva, L. R., Amitai, Y. und Connors, B. W. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251: 432-435, 1991.
- Sisodiya, S. M. Surgery for malformations of cortical development causing epilepsy. *Brain* 123: 1075-1091, 2000.
- Speckmann, E. J. und Walden, J. Mechanisms underlying the generation of cortical field potentials. *Acta Otolaryngol.Suppl* 491: 17-23, 1991.
- Suzuki, M. und Choi, B. H. Repair and reconstruction of the cortical plate following closed cryogenic injury to the neonatal rat cerebrum. *Acta Neuropathol.(Berl)* 82: 93-101, 1991.
- Zilles K. The cortex of the rat. *Berlin, Springer-Verlag.* 1992.

Zilles K. und Wree A. Cortex: areal and laminar structure. In Paxinos G ed. *The rat nervous system. San Diego, Academic press. 1995, 649-685.*

Zilles, K., Qu, M., Schleicher, A. und Luhmann, H. J. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA(A) and GABA(B) receptors. *Eur.J.Neurosci. 10: 3095-3106, 1998.*

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. O. W. Witte für die freundliche Überlassung des Themas, die fachliche sowie finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die Möglichkeit, Erfahrungen auf wissenschaftlichem Gebiet zu sammeln, die über meine Dissertation hinaus gingen.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. C. Redecker bedanken, der mich aufs Beste fachlich betreute und durch seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie wertvollen Anregungen die Arbeit nie ins Stocken geraten ließ und seine Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten an mich weitergab.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. E.-J. Speckmann für die Bereitstellung des optischen Arbeitsplatzes an seinem Institut und die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, durch die mein Verständnis für die Neurophysiologie sehr gefördert wurde. Frau B. Herrenpoth möchte ich für die hervorragende technische und organisatorische Hilfe danken sowie ihren ansteckenden Arbeitseifer.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Neurologie danke ich sehr für die heitere und kollegiale Zusammenarbeit im Labor, die mir die zähen Zeiten außerordentlich erleichterte.

Mein ganz persönlicher Dank gebührt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und deren Interesse an meiner Arbeit und ihr Vertrauen in meine Leistung mir stets ein Ansporn waren.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Freund Lasse Krug, der insbesondere in den anstrengenden Phasen meine Arbeitsenergie mit viel Gelassenheit und Optimismus aufrechterhielt.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Adresse	Sabine Quill Malmöer Str. 7 10439 Berlin
e-mail	SabineQuill@web.de
geboren am	13. Dezember 1976
geboren in	Hamm (Westfalen)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### **Ausbildung**

1983 – 1987	Grundschule, Hamm
1987 – 1996	Gymnasium Hammonense, Hamm
April 1996	Abitur
Oktober 1996	Aufnahme des Medizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
September 1998	Ärztliche Vorprüfung
August 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2002	Studienplatzwechsel an die Humboldt Universität Berlin und Beginn des Praktischen Jahres
November 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Januar 2004	Ärztin in Weiterbildung, Klinik für Neurologie, Charité Campus Benjamin Franklin Berlin

### **Wissenschaftliche Arbeit**

seit September 2001	Dissertation über Erregbarkeitsänderungen in der Umgebung experimentell induzierter fokaler kortikaler Dysplasien in einer Studie mit spannungssensitiven Farbstoffen, in der Experimentellen Neurologie der Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. O. W. Witte
seit April 2002	In-vitro Studie über Erregbarkeitsänderungen in der Periinfarktzone nach Okklusion der mittleren Zerebralarterie, in der Experimentellen Neurologie der Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. O. W. Witte und in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. E.-J. Speckmann, Institut für Physiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
April – Oktober 2002	Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF)
November 2002	Women in Neuroscience / Eli Lilly Student Travel Award und Teilnahme am Annual Meeting der Society for Neuroscience in Orlando, Florida

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

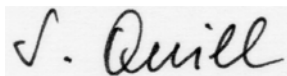
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. med. O. W. Witte und Herr Priv.-Doz. Dr. med. C. Redecker sowie Herr Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.



Jena, 18.12.2004